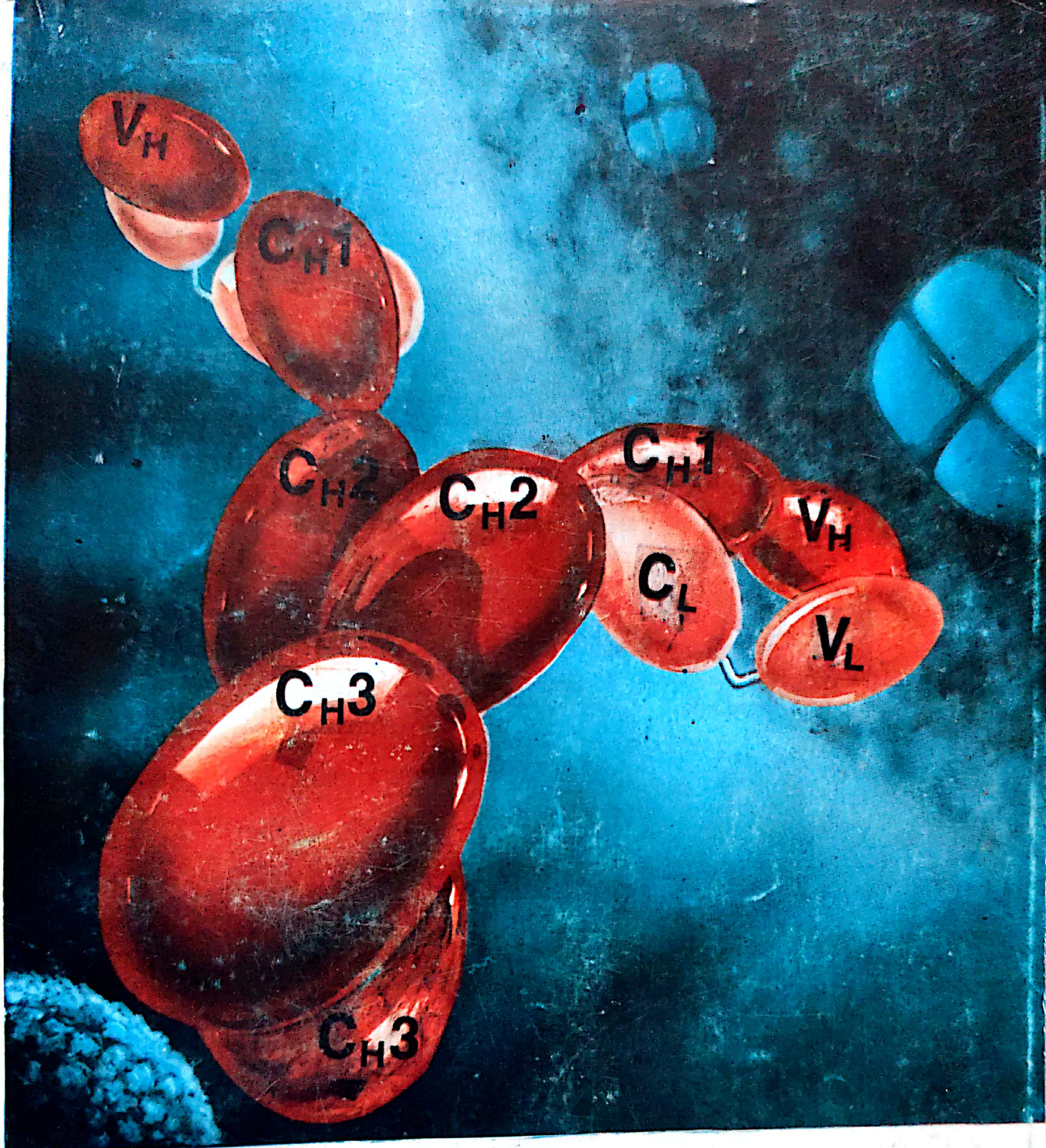



ANDREI OLINESCU

# IMUNOLOGIE

Dr. ANDREI OLINESCU

# IMUNOLOGIE



EDITURA DIDACTICĂ ŞI PEDAGOGICĂ R.A. - BUCUREŞTI, 1995

**ISBN 973 - 30 - 3066 - X**

**Redactor**: RODICA MIHĂILESCU
**Tehnoredactor**: ELENA OPRIŞEANU
**Culegere şi paginare computerizată**: CARMEN MARINESCU, DRAGOŞ OPRIŞEANU
**Coperta**: DOINA BARANOVSCHI

# INTRODUCERE

Imunologia este ştiinţa care se ocupă cu studiul mecanismelor prin care organismul reuşeşte să facă distincţia dintre structurile proprii, pe care le acceptă, şi cele străine lui, pe care le elimină. Aceste "structuri străine" sunt recunoscute datorită unor organizări moleculare particulare, diferite de cele specifice gazdei.

Ele pot proveni din exterior sau se pot forma în intimitatea organelor şi ţesuturilor şi pot, în majoritatea cazurilor, genera răspuns imun specific care le neutralizează şi elimină.

Această supraveghere imunologică permanentă este realizată de către un sistem complex denumit *sistemul imun*, alcătuit din *organe*, *celule* şi *molecule* cu funcţii bine definite.

Deşi acumularea cunoştinţelor în domeniul imunologiei teoretice se face într-un ritm extrem de rapid, totuşi, există încă multe aspecte care-şi aşteaptă elucidarea. Desigur, acestea devin pe zi ce trece tot mai puţine.

Ştiinţa imunologică actuală a fost generată de observarea unor fenomene biologice şi patologice şi de încercarea empirică de influenţare a lor. Omul, din timpuri imemoriale, a observat că acei care au contractat o boală contagioasă şi s-au vindecat spontan deveneau rezistenţi la un nou contact cu bolnavii care sufereau de aceeaşi boală, în sensul că ei nu o mai contractau a doua oară. Această observaţie a avut o importanţă covârşitoare, ea stând de fapt la baza imunologiei moderne. Se pare că prima semnalare scrisă a rezistenţei dobândite faţă de o boală contagioasă o face TUCIDIDE, care descrie în anul 430 înainte de Hristos o epidemie în Atena, menţionând că "acelaşi om nu era niciodată atacat a doua oară de boală, sau, cel mult, făcea o formă uşoară". Aceşti oameni puteau sfida tragediile generate de către epidemiile care secerau atâtea vieţi.

Pe baza acestor observaţii, s-a început folosirea "agresorului" pentru neutralizarea propriei agresivităţi, prin inocularea deliberată a materialului infect bănuit a fi responsabil de producerea şi difuzarea bolii. Cel mai utilizat, probabil pentru că era cel mai accesibil iar boala provoca epidemii groaznice, a fost conţinutul pustulelor variolice, "inoculat" la persoane sănătoase. Procedeul, denumit "variolizare", a fost aplicat pentru prima dată în China, de acolo a ajuns în Orientul Apropiat, pentru ca în anul 1721, Lady Mary WORTLEY MONTAGU, soţia ambasadorului englez la Constantinopol, să-l introducă în Anglia, de unde s-a extins în Europa.

Variolizarea nu era însă lipsită de riscuri, deoarece pe de o parte provoca boala naturală, iar pe de altă parte, contribuia la difuzarea ei şi menţinerea rezervorului de virus.

În anul 1798, E.W.JENNER, un talentat medic englez, foloseşte pentru profilaxia variolei umane virusul variolei bovine ("vaccina"), înrudit antigenic cu cel al variolei omului, dar nepatogen pentru acesta. Cu acest eveniment crucial, se

încheie epoca observaţiilor şi practicilor empirice şi se deschide era ştiinţifică a imunologiei.

La data de 9 VIII 1880, L.PASTEUR comunica în şedinţa Academiei Franceze reuşita primei imunizări active din istoria omenirii, obţinută cu germeni patogeni atenuaţi *in vitro*. Găinile, inoculate cu germenii atenuaţi ai holerei aviare, au supravieţuit infecţiilor experimentale cu doze cert letale. Ulterior, folosind aceleaşi procedee, el reuşeşte să protejeze oile de infecţia experimentală cu *Bacillus antracis* şi oamenii de infecţia rabică, denumind acest procedeu de imunizare "vaccinare", denumire dată în onoarea lui JENNER, care a folosit pentru prima dată "vaccina".

Descoperirile în sfera microbiologiei se amplifică, generând în acelaşi timp embrionul unei viitoare ştiinţe: IMUNOLOGIA. După cum era şi firesc, în faza "copilăriei" sale aceasta a fost total dependentă de microbiologie şi virusologie, crezându-se că apărarea imună este prin excelenţă o funcţie antimicrobiană. L.PASTEUR, prin vaccinare, a demonstrat că agentul infecţios provoacă boala dar are şi puterea de a induce un răspuns imun protector. Prin atenuarea patogenităţii lui, se poate realiza disocierea dintre cele două efecte, reţinându-se numai capacitatea protectoare. Aşadar, observaţiile clinice şi datele experimentale demonstrau fără echivoc că organismul, odată venit în contact cu un agent microbian, se poate apăra de el. Mai mult, la o nouă întâlnire cu acelaşi agresor, reacţia lui de apărare este mult mai eficientă.

Dar care sunt mijloacele prin care se realizează aceste reacţii protectoare?

În anul 1883, I.MECINICOV descoperă existenţa celulelor fagocitare şi fenomenul de fagocitoză, lansând prima teorie celulară a imunităţii. Conform ei, agresorii bacterieni sunt "fagocitaţi", adică "mâncaţi" de către unele celule ale organismului, astfel că multiplicarea lor şi lezarea organismului gazdă nu mai sunt posibile. Concepţia "celulară" a lui MECINICOV a intrat în conflict cu cea "umorală", susţinută de P.EHRLICH, E.A. von BEHRING şi R.KOCH, care vedeau în anticorpi, şi nu în celulele fagocitare, mijlocul principal de apărare imună. Ambele concepţii erau corecte, numai că susţinătorii lor nu dispuneau încă de informaţiile necesare care le-ar fi permis acceptarea acestui fapt. P.EHRLICH recunoaşte importanţa utilizării unei metodologii riguroase în studiul anticorpilor, intuind că în reacţia acestora cu agresorii (antigenele) sunt generate relaţii chimice stabile. Tot el lansează o teorie originală referitoare la sinteza anticorpilor şi funcţiile lor de receptori la nivelul membranei celulare, teorie confirmată în cvasitotalitate de către cercetările actuale.

Astăzi, se poate afirma că evoluţia imunologiei în ultimele 11 decenii a parcurs trei etape distincte.

Prima, cea de la sfârşitul secolului XIX şi începutul secolului XX, era orientată aproape în exclusivitate spre problematica bacteriologică. Se studiau vaccinurile antimicrobiene, serurile imune, modalităţile practice de seroterapie, de serodiagnostic etc. În această etapă se aplică reacţia de fixare a complementului şi începe introducerea biochimiei în practica imunologică. Tot acum începe să devină evident faptul că nu numai bacteriile sunt antigenice, dar şi ţesuturile animale, şi că procesele imune nu întotdeauna sunt benefice, febra de fân, astmul bronşic şi altele fiind manifestări periculoase pentru organism mediate de către anticorpi.

A doua etapă debutează cam la jumătatea deceniului 2 al secolului XX cu cercetările de imunochimie ale lui K.LANDSTEINER şi M.HEIDELBERG, care aveau ca obiectiv major studiul molecular al antigenelor şi anticorpilor. Arne TISELIUS, Th. SVEDBEG iar mai târziu Rodney PORTER, Gerald Maurice EDELMAN şi alţii au adus contribuţii remarcabile la înţelegerea structurii şi pro-

prietăţiilor fizico-chimice şi biologice ale moleculelor de anticorpi. Tot acum se extind preocupările teoretice prin lansarea de teorii "instructive" opuse celei "selective" a lui P.EHRLICH. Felix HAUROWITZ şi Linus PAULING emit "teoria matriţei", conform căreia antigenul ar acţiona ca o "matriţă" asupra anticorpului, imprimându-i o formă complementară care-l face să poată recunoaşte specific "matriţa" care l-a generat. Teoria, adoptată iniţial fără rezerve, s-a dovedit ulterior a fi eronată.

A treia etapă, care marchează era modernă a imunologiei, debutează imediat după cel de-al doilea război mondial. Lucrările lui Peter MEDAWAR, Niels JERNE şi Mac Fairlain BURNET revoluţionează gândirea şi cercetarea imunologică. În 1955-1956, M.F. BURNET lansează "Teoria Selecţiei Clonale" şi a supravegherii imunologice, confirmată ulterior. În 1960, R. GOOD în S.U.A. observă că pacienţii cu timoame sunt hipogammaglobulinici şi prezintă diverse disfuncţii imune. În acelaşi timp, J.F.A.P. MILLER începe în Australia o serie de studii privind rolul timusului în patogeneza unor forme de leucemii virale la şoarece. Împreună cu R. GOOD, precizează rolul acestui organ în apărarea imună, demonstrând că timectomia neonatală alterează capacitatea de rejecţie a alogrefelor şi de sinteză a anticorpilor, efecte care nu se înregistrează în cazul timectomiei la adulţi. De aici concluzia că timusul este un organ cu rol central în maturarea funcţională a efectorilor imunităţii. Câţiva ani mai târziu (1966), H.M. CLAMAN, folosind şoareci iradiaţi letal şi reconstituiţi cu celule din timus sau din măduvă osoasă, dovedeşte existenţa a două clase distincte de limfocite care participă la sinteza de anticorpi: una, educată în timus şi denumită clasa "timo-dependentă" sau *T*, care nu sintetizează anticorpi dar ajută pe cea de-a doua clasă, educată în măduva osoasă şi denumită *B*, care poate sintetiza anticorpii numai cu ajutorul limfocitelor *T*.

Prin aceste cercetări Imunologia face un salt uriaş, trecând de la obiectivul principal şi aproape unic al studiului mijloacelor de apărare anti-infecţioasă la cercetări privind imunitatea de transplant, imunitatea antitumorală, genetica moleculară, natura şi funcţiile receptorilor de membrană, mecanismele care stau la baza declanşării şi reglării răspunsului imun etc.

În anul 1953, J.WATSON şi F.CRICK descoperă structura moleculară a ADN, în 1956 G.D.SNELL defineşte complexul major de histocompatibilitate H-2 la şoarece iar M.SELA, în 1960, obţine antigene sintetice care devin instrumente de mare valoare pentru înţelegerea condiţiilor moleculare necesare declanşării unui răspuns imun. Amploarea pe care o iau cercetările imunologice şi avalanşa de informaţii obţinute de către diverse laboratoare a făcut necesară organizarea difuzării acestor informaţii, la început pe plan naţional şi apoi internaţional.

Se înfiinţează, începând cu anul 1960, "Societăţi de Imunologie" în S.U.A. şi Anglia, apoi în Canada, Israel, Elveţia, Franţa, Australia etc. Dar, foarte curând a devenit evident faptul că sfera informaţiilor trebuie să depăşească limitele unui stat, pentru ca cercetătorii din diferite colţuri ale lumii să folosească aceeaşi terminologie şi să-şi efectueze cercetările în condiţii "standard" care să fie reproductibile în oricare alt laborator.

Această necesitate a făcut ca la data de 5 mai 1969, la Bruges, în Belgia, societăţile naţionale de Imunologie din S.U.A., Anglia, Canada, Germania, Israel, Polonia, Suedia, Franţa şi Iugoslavia să se asocieze formând "Uniunea Internaţională a Societăţilor de Imunologie" (IUIS), ale cărei sarcini erau:

a) organizarea cooperărilor pe plan naţional şi internaţional ale cercetărilor de imunologie;

b) asigurarea ameliorării şi dezvoltării problemelor de educaţie ştiinţifică, standardizare etc. în imunologia fundamentală şi practică;

c) realizarea cooperărilor cu diferite alte organizaţii internaţionale.

În ţara noastră, prin hotărârea Prezidiului Academiei de Ştiinţe Medicale, la data de 12 februarie 1971 se înfiinţează "Comisia Naţională de Imunologie", care aderă la IUIS şi care realizează obiectivele majore ale acesteia: colaborarea între cercetători, difuzarea informaţiilor, stabilirea de legături cu alte societăţi, standardizarea unor tehnici de lucru etc. Aceste obiective au putut fi înfăptuite prin manifestări ştiinţifice anuale organizate ca "reuniuni naţionale de imunologie" în centrele de învăţământ medical din Bucureşti, Iaşi, Cluj-Napoca, Timişoara, Târgu-Mureş, Craiova, prin "seminarii metodologice", cursuri de imunologie etc. Din nefericire, datorită izolării impuse de un regim politic nefast, cercetarea imunologică românească nu a avut o ascendenţă firească deoarece, pe de o parte, sărăcia din dotarea materială a laboratoarelor şi lipsa de informaţie ştiinţifică impuneau un ritm lent sau chiar o stagnare a activităţii, iar pe de altă parte, cercetătorii cei mai dotaţi foloseau orice prilej pentru a părăsi ţara, angajându-se în laboratoarele occidentale unde-şi puteau desfăşura plenar potenţialul lor intelectual. Această masivă hemoragie de inteligenţă ne-a costat şi ne costă încă foarte mult. În timp ce noi "stăteam pe loc", în lume acumularea de informaţii ştiinţifice devenea explozivă.

Unde a dus această acumulare? Astăzi ştim că răspunsul imun se caracterizează prin specificitate, memorie şi autocontrol, procese extrem de complexe, care au loc la nivel celular şi molecular. Recunoaşterea agresorului străin de către organism se face specific, de către "receptori" de pe membrana limfocitelor *T* şi *B*, predestinate pentru această funcţie. În organism există atâtea tipuri (clone) de limfocite *T* şi *B* câte tipuri de antigene sunt în natură, fiecare clonă fiind specializată în recunoaşterea unui singur determinant antigenic în condiţiile în care el este asociat cu nişte antigene proprii organismului, adică "sub restricţia complexului major de histocompatibilitate (MHC)".

Sunt cunoscute genele care controlează sinteza moleculelor de imunoglobulină şi sinteza receptorilor pentru antigen de pe membrana plasmatică a limfocitelor *T*, a fost descoperită existenţa unei mari populaţii de molecule de citokine cu rol de mesageri informaţionali, se descifrează procesele biochimice de la nivelul citoplasmei declanşate ca urmare a fixării ligandului la receptorii de membrană etc.

Imunologia actuală este departe de sfera preocupărilor ei de la sfârşitul celui de-al II-lea război mondial. Ea nu mai este o ramură a bacteriologiei, ci poate cea mai complexă ştiinţă biologică de la care se aşteaptă rezolvări în diferite domenii ale patalogiei.

Complexitatea acestei ştiinţe face ca încercarea de a scrie o carte de imunologie de către o singură persoană să fie un act de mare curaj. Cu toate acestea, m-am hazardat să depun acest efort în speranţa că experienţa de mulţi ani în acest domeniu mă va ajuta să selectez tot ceea ce este deja bine stabilit, astfel ca acei mai puţin informaţi să poată avea un material cât de cât selectat, care să le permită o mai uşoară înţelegere a acestei ştiinţe. În multe capitole din acest volum sunt puncte de vedere personale sau contribuţii personale care, desigur, trebuie acceptate sub rezerva confirmării sau infirmării lor ulterioare. De asemenea, unele

figuri, fotografii, tabele sau alte date experimentale sunt obţinute sau concepute în decursul anilor de cercetare experimentală.

Sunt total împotriva practicii de a scrie "cărţi din cărţi", deoarece aceasta este dăunătoare prin dezinformarea pe care o generează. Cărţile trebuie scrise doar de către cei care au lucrat şi au o oarecare experienţă personală în domeniul de activitate respectiv şi nu de către cei cărora "li se pare că ştiu câte ceva".

Sper ca acest volum să fie util celor interesaţi şi să ajute la înţelegerea unor probleme de imunologie teoretică şi practică.

O valoroasă contribuţie la apariţia acestui volum au avut-o medicii Dana şi Grigore LĂZĂRESCU, precum şi d-nele Vasilica MITULEŢ şi Elena-Violeta ENE, cărora autorul le aduce caldele sale mulţumiri.

# ANTIGENE

Prin *antigen*, termen folosit pentru prima dată în anul 1899 de către L. DEUTSCH, se înţelege acea entitate care poate induce declanşarea de reacţii imune din partea organismului şi poate reacţiona specific cu produşii acestor reacţii. Capacitatea de a induce reacţii imune este cunoscută sub denumirea de *imunogenitate*, iar reacţia specifică, *reactivitatea antigenică*.

Antigenele pot proveni din afara organismului; având deci origine *exogenă*, sau pot avea origine *endogenă*, formându-se în interiorul acestuia. Atunci când sunt recunoscute de către celulele sistemului imun ele declanşează o serie de procese, şi anume:

a) sinteza anticorpilor cu specificitate de recunoaştere pentru el;
b) activarea proliferării policlonale sau monoclonale a limfocitelor;
c) instalarea memoriei imunologice;
d) în unele situaţii, poate induce un răspuns imun exagerat (hipersensibilitate), sau poate anula răspunsul imun (toleranţă imunologică).

De regulă, există o relaţie directă între mărimea moleculei de antigen şi capacitatea sa de a induce reacţii imune considerându-se că, cu cât molecula este mai mare, cu atât antigenicitatea ei este mai evidentă. În general, antigenele au greutate moleculară între 4 şi 20 KD deşi există şi excepţii, cum ar fi insulina, care are greutate moleculară de 1-1,5 KD. O explicaţie a relaţiei existente între dimensiunea moleculei şi antigenicitatea sa ar fi aceea că moleculele mari sunt mai bine fagocitate şi prelucrate de către celulele antigen-prezentatoare. De asemenea, moleculele mari ar avea mai mulţi determinanţi antigenici, putând stimula un număr mai mare de clone de limfocite *T* şi *B*. În afară de dimensiunea moleculei, o influenţă majoră asupra conferirii condiţiei de antigen ar fi cea de "străin", de non-propriu (non-self). Prin termenul de "non-propriu" nu se înţelege ceva care în mod obligatoriu nu aparţine organismului, ci un aranjament particular în secvenţa reziduurilor de aminoacizi din structura primară a lanţului polipeptidic. Acest aranjament particular care constă din amplasarea unui aminoacid într-o altă poziţie decât cea care există la lanţul primar al proteinei proprii, poate fi expus la suprafaţa moleculei datorită conformaţiei ei sterice şi recunoscut ca străin, inducând reacţii imune care vizează eliminarea lui.

Pot fi antigene substanţele de origine bacteriană, vegetală, animală, care din punct de vedere structural pot exista sub formă de molecule, celule sau ţesuturi, iar din punct de vedere chimic pot fi proteine, glucide, lipide, glicoproteine, glicolipide sau acizi graşi.

# CONDIŢII ŞI FACTORI CARE DETERMINĂ ANTIGENICITATEA

În general, există o serie de condiţii pe care trebuie să le îndeplinească o substanţă pentru a fi antigenică. Acestea se referă la molecula de antigen, la organismul care este stimulat şi la modalitatea în care se realizează accesul antigenului la sistemul imun al organismului.

## CONDIŢII DEPENDENTE DE ANTIGEN

După cum menţionam anterior, **greutatea moleculară** are un rol important în realizarea antigenicităţii, bune imunogene fiind moleculele cu greutate mai mare de 40 kD. Sunt însă situaţii în care molecule mici, ca de pildă glucagonul, cu greutatea de 3,8 kD, sunt imunogene, iar altele, cu greutate mare, cum ar fi gelatina sau dextranul, nu sunt imunogene. Se pare că imunogenitatea unor polipeptide cu greutate moleculară mică s-ar datora printre altele şi legării lor la unele componente proprii organismului, care ar avea rol de "grupări purtătoare" făcîndu-le astfel accesibile limfocitelor.

Calitatea de **non-propriu,** de străin, de incompatibil, este o condiţie esenţială. Ea este determinată de structura sterică a moleculei care permite expunerea la suprafaţa ei a acelor secvenţe de aminoacizi care nu se găsesc la proteinele organismului, fiind deci străine de acestea. Dacă, de exemplu, în lanţul primar polipeptidic al unei proteine, la poziţiile 125-130 sunt secvenţele Arg-Lys-His-Leu-Asp-Tyr, iar la proteina altui organism secvenţa este Arg-Lys-Tyr-Asp-Leu, cea de a doua proteină, cu secvenţa ei străină este recunoscută ca non-proprie şi eliminată de către sistemul imun al organismului în care a pătruns.

**Rigiditatea moleculei** este obligatorie deoarece, prin rotirea liberă în jurul axului propriu al moleculei a determinanţilor ei antigenici, se pierde imunogenitatea, receptorii pentru antigen de pe suprafaţa limfocitelor fiind "păcăliţi", în permanenţă prezentându-li-se alţi determinanţi. De exemplu, gelatina, deşi are greutate moleculară mare, nu este imunogenă deoarece, datorită bogăţiei în reziduuri de Gly, este lipsită de rigiditate. Dacă însă i se măreşte conţinutul în Tyr sau în Trp, ori în Phe-Al, molecula devine stabilă şi implicit antigenică.

**Izomerismul optic** influenţează imunogenitatea, moleculele cu reziduuri de aminoacizi levogiri *(L)* fiind mai imunogene decât cele cu aminoacizi dextrogiri *(D)*. Se pare că moleculele *L* sunt mai imunogene deoarece pot fi mai uşor degradate de către unele enzime cum ar fi pepsina, tirozina, papaina din fagolizozomii celulelor fagocitare. În urma degradării lor, se pot transmite mai rapid şi mai eficient informaţiile stimulatoare. De regulă, cu cât molecula de antigen este mai uşor desfăcută în părţile ei componente de către enzimele lizozomale ale macrofagelor, cu atît imunogenitatea sa este mai mare.

**Persistenţa moleculei** în organism şi mai cu seamă a părţilor sale responsabile de inducerea răspunsului imun (determinanţii antigenici numiţi şi epitopi) influenţează imunogenitatea ei. Substanţele care sunt complet degradate, cum este cazul celor fagocitate de către granulocitele polimorfonucleare (PMN), nu pot stimula funcţiile imune, deoarece li s-a distrus componenta imunogenă specifică, respectiv epitopii. Atât eliminarea rapidă a antigenului cât şi remanenţa sa ca moleculă intactă, nedegradată, în interiorul celulei fagocitare, scade antigenicitatea până la anularea ei. Pentru ca să fie bune imunogene, substanţele

străine de organism trebuie să rămână un anumit timp în intimitatea sistemului limfoid, timp care să nu fie nici prea scurt nici prea lung, adică să nu fie degradată nici prea rapid dar nici prea lent.

**Compoziţia chimică a moleculei** are o importanţă covârşitoare. Proteinele şi glicoproteinele sunt foarte bune antigene, pe când lipidele, glucidele şi acizii nucleici sunt slab imunogene.

**Modul de exprimare a epitopului** pe suprafaţa moleculei condiţionează imunogenitatea sa. Dacă epitopii sunt ascunşi în interiorul moleculei şi, ca atare, nu sunt accesibili receptorilor pentru antigen de pe membrana celulelor sistemului imun, atunci recunoaşterea lor nu se poate face, stimularea funcţiilor imune nemaiavând loc.

## CONDIŢII CARE SE REFERĂ LA ORGANISMUL GAZDĂ

Una dintre ele este **maturitatea sistemului limfoid**, adică câştigarea competenţei funcţionale. Inocularea unui antigen la un organism incompetent imunologic, care încă nu şi-a dezvoltat precursorii celulari, fiind lipsit de limfocite care să exprime receptori pentru el, nu numai că nu induce răspuns imun, dar poate duce chiar la toleranţă sau paralizie imunologică.

**Vârsta organismului** poate influenţa răspunsul, de regulă la vârstele extreme, perinatală sau bătrâneţe, acesta fiind mai slab decât la maturitate. Imediat după naştere, sistemul imun încă nu este suficient de matur funcţional, iar la vârstele înaintate intervin modificări fiziologice care provoacă declinul său. Acestea constau în special din scăderea funcţiilor limfocitelor *T*, creşterea procentului de limfocite *T* supresoare, scăderea activităţii celulelor *NK* etc. (tabelul 1).

*Tabelul 1*

**Procentul limfocitelor *T* totale, al limfocitelor *T* supresoare (*Ts*) şi raportul CD4/CD8 la persoanele adulte şi la bătrînii aparent sănătoşi (valorii medii + DS a mediei)**

| Categoria de vârstă | Nr. subiecţi | Procentul celulelor formatoare de rozete $E_t$ şi $E_{45}$ | | Raport CD4/CD8 |
|---|---|---|---|---|
| | | $E_t$ | $E_{45}$ | |
| Bătrâni | 52 | 56,91 ± 2,80 | 24,40 ± 4,40 | 1,02 ± 0,15 |
| Adulţi | 75 | 59,88 ± 1,50 | 14,42 ± 1,90 | 1,75 ± 0,09 |

$E_t$ = limfocite *T* totale; $E_{45}$ = limfocite *T* supresoare

Se instalează o imunodepresie fiziologică în mare măsură responsabilă de creşterea incidenţei bolilor neoplazice.

**Condiţia fiziologică a organismului** în momentul contactului cu antigenul influenţează răspunsul imun. În cursul sarcinii, la persoanele tratate timp îndelungat cu corticosteroizi sau cu diverse substanţe imunodepresoare, stimulul antigenic poate fi inoperant deoarece organismul nu poate recepţiona sau nu poate reacţiona la intensitatea normală, fiziologică. Copiii cu atimie congenitală sau cei cu agammaglobulinemie legată de sex (sindrom Bruton) nu pot răspunde la stimuli cu antigene timodependente sau independente, ca de

altfel şi persoanele infectate cu virusul imunodeficienţei umane (HIV) care distruge limfocitele *T*.

**Specia animalului** este alt factor horărâtor. Cu cât antigenul provine de la o specie îndepărtată filogenetic de specia căreia îi aparţine animalul imunizat, cu atât acesta va dezvolta reacţii imune mai puternice. Sunt însă şi excepţii de la această regulă, în sensul că antigene îndepărtate filogenetic nu sunt bune imunogene, deoarece au o conformaţie sterică şi, deci, şi o secvenţă primară a reziduurilor de aminoacizi apropiată până la identitate de cea a proteinelor organismului gazdă. Este cazul hemoglobinei de cal care nu este un bun antigen pentru iepure, sau al insulinei de cal şi bou care este foarte apropiată structural de insulina umană şi, deci, tolerată de om. La speciile apropiate filogenetic, cum este cazul omului şi primatelor, diferenţele de structură proteică sunt foarte mici şi uneori aproape inexistente, aşa că înlocuirea interspecie a proteinelor poate da un răspuns imun slab sau chiar nul.

## MODALITATEA DE ADMINISTRARE A ANTIGENELOR

Aceasta influenţează în mod pozitiv sau negativ imunogenitatea, ca şi comportamentul organismului la care acestea au fost inoculate.

Din acest punct de vedere, au importanţă: *calea de inoculare, cantitatea inoculată (doza), intervalul* dintre inoculări, *asocierea cu adjuvanţi* etc. De exemplu, multe antigene sunt mai imunogene dacă sunt inoculate intradermic sau intraganglionar, dovedindu-se slab omogene atunci când sunt inoculate pe cale subcutanată sau intravenoasă. În general, antigenele solubile, moleculare, sunt mai imunogene când sunt inoculate intradermic decât intravenos. Dozele prea mari sau prea mici pot avea efecte contrare celor scontate, în sensul că, în loc de răspuns imun pot induce toleranţă imunologică "de zonă înaltă" sau de "zonă joasă".

Administrarea prelungită şi la intervale scurte a aceluiaşi antigen poate realiza supresia şi nu activarea funcţiilor imune. Un antigen poate stimula funcţiile imune mult mai eficient atunci când este administrat împreună cu un adjuvant sau sub formă de complex antigen-anticorp, deoarece este mai bine fagocitat de către macrofage şi mai bine prezentat celulelor limfoide.

Deci, imunogenitatea unei molecule sau a unui complex de molecule este influenţată de către un mare număr de factori dependenţi de modul de alcătuire a antigenului, de organismul gazdă şi de modul de acces la acest organism. Cunoaşterea acestor condiţii, în afară de valoarea lor teoretică, are o deosebită importanţă practică, fiind foarte utilă în stabilirea corectă a unor scheme de vaccinare.

## ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A MOLECULEI DE ANTIGEN

Din toată molecula de antigen, numai unele arii mici, cu suprafaţa de aproximativ 7 m $\mu^2$, accesibile celulelor sistemului imun, îi conferă specificitate antigenică, restul moleculei având rolul de "purtător" al acestora.

Aceste arii, sau situsuri antigenice, alcătuiesc *grupările determinante* sau *epitopii* moleculei de antigen.

După cum se ştie, atât proiectarea la exteriorul moleculei, cât şi conformaţia acesteia, sunt condiţionate de structura primară a lanţului polipeptidic şi implicit de cele secundară şi terţiară. Deci, epitopii nu sunt altceva decît nişte segmente mai mari sau mai mici din lungimea unui lanţ polipeptidic, la nivelul căruia amino-acizii se succedă într-o secvenţă parti-culară, formând determinante secvenţiale, care diferă de cele din lanţurile proteice ale gazdei şi care generează formarea de situsuri antigenice cunoscute ca non-proprii de către sistemul imun al acesteia.

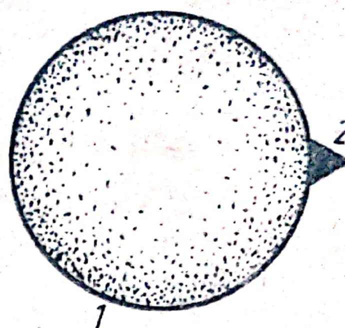



Fig.1. Modul de alcătuire a antigenului. 1- "gruparea purtătoare" sau "carrier"; 2 - "gruparea determinantă" sau "epitop". Pe gruparea purtătoare pot fi exprimaţi mai mulţi epitopi cu specificităţi diferite, fiecare dintre ei fiind recunoscuţi de către limfocite care au receptori specifici pentru ei. Epitopii conferă specificitate de recunoaştere antigenului, iar grupările purtătoare dimensiunile necesare pentru a putea fi recunoscut de către celulele sistemului imun.

Pe suprafaţa unei singure molecule poate exista un număr diferit de epitopi cu specificităţi multiple, molecula nefiind de fapt un "antigen unic" ci un "mozaic de antigene", cu un număr mai mare sau mai mic de epitopi, număr condiţionat de mărimea şi complexitatea chimică a ei. De exemplu, pe o moleculă de ovalbumină cu greutatea de cca. 40 kD există 5 epitopi diferiţi iar pe una de tireoglobulină cu greutatea moleculară de 700 kD există cca. 40 de epitopi.

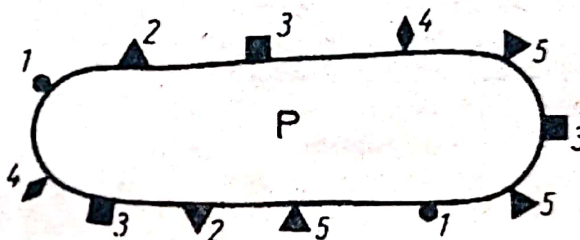



Fig.2. Gruparea purtătoare (P) "poartă" mai mulţi epitopi, cu specificităţi diferite (1,2,3 etc.)

Epitopul are de fapt o funcţie haptenică simplă, în sensul că poate reacţiona cu anticorpul, dar nu poate declanşa singur sinteza acestuia. Pentru aceasta, este necesară intervenţia unei componente care să-l "poarte", conferind complexului format o anumită dimensiune care-l face "vizibil", accesibil limfocitelor. Această parte de moleculă se numeşte "grupare purtătoare" sau, în terminologia anglo-saxonă, "carrier". Schematic, un imunogen este alcătuit dintr-o grupare purtătoare care-i conferă dimensiuni şi accesibilitate şi una sau mai multe tipuri de "grupări determinante" sau "epitopi" care-i conferă specificitate antigenică (fig. 1; fig. 2).

Rolul imunologic major revine epitopilor care, de regulă, sunt expuşi în locurile cele mai periferice şi mai accesibile ale moleculei. De obicei, un epitop este format din 15-20 de reziduuri de aminoacizi, dintre care numai 5-6 sunt esenţiali. Ei sunt situaţi fie la extremitatea $NH_2$ terminală a lanţului polipeptidic, cum este cazul epitopilor de la nivelul eritrocitelor sau mioglobulinei, fie de-a lungul lanţului, cum este cazul polizaharizilor pneumococici. În componenţa epitopilor se găsesc frecvent, cu poziţiile schimbate în secvenţa primară, Tyr, Phe-Al şi Trp, deşi şi alte reziduuri pot conferi antigenicitate moleculei datorită schimbării poziţiei lor.

Din punct de vedere al organizării, epitopii sunt *continui* şi *discontinui*. Epitopii continui sunt nişte fragmente peptidice liniare, capabile să se lege la anticorpi, iar cei discontinui, care reprezintă majoritatea, au secvenţa reziduurilor principale

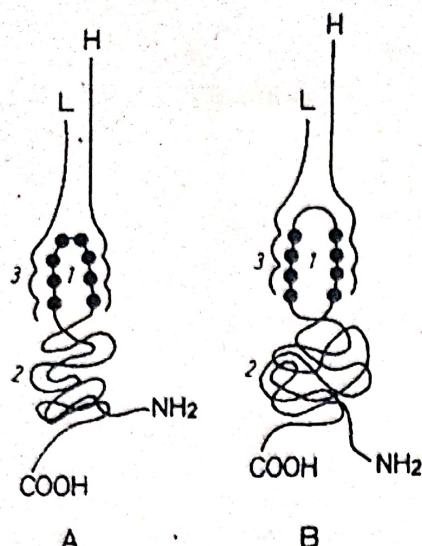



Fig.3. Epitopi "continui" (A) şi "discontinui" (B). Pe gruparea purtătoare determinanţii antigenici pot fi situaţi unul lângă altul (A), sau pot fi grupaţi la distanţe diferite (B) care însă, prin plierea moleculei, sunt recunoscuţi de către anticorp exact ca şi epitopii continui.

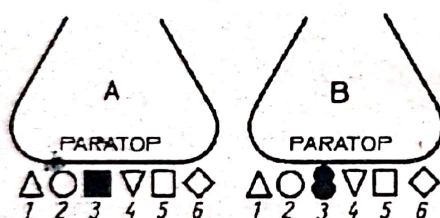



Fig.4. Înlocuirea unui epitop cu altul nu modifică substanţial potenţialul de recunoaştere a antigenului de către anticorp (paratop). Anticorpul A recunoaşte specific antigenul care are 6 epitopi diferiţi, chiar dacă un epitop (3) este înlocuit cu altul.

întreruptă de reziduuri care nu participă la unirea cu anticorpul dar care, prin plierea lanţului primar, sunt îndepărtaţi de secvenţa din moleculă de către anticorpi, secvenţă numită "paratop" – care leagă epitopul antigenului. Aşadar, segmentele discontinue ale epitopului sunt până la urmă apropiate unele de altele, realizându-se de fapt o continuitate a lor (fig.3). Epitopii discontinui sunt recunoscuţi de către paratopii anticorpilor numai dacă molecula este intactă. Dacă este ruptă, fragmentele liniare individuale nu mai sunt practic recunoscute.

În orice caz, antigenicitatea epitopilor este influenţată de către o serie de factori ca:

*a. Hidrofilia lor.* Reziduurile aminoacide hidrofile au tendinţa să fie expuse la suprafaţă şi, deci, să aibă şanse crescute de a participa la alcătuirea epitopilor.

*b. Terminaţiile $NH_2$ şi COOH ale lanţurilor,* care de obicei sunt expuse la suprafaţă.

*c. Mobilitatea atomică a lanţului peptidic,* poziţia multor epitopi pe moleclă corespunzând regiunilor de mare mobilitate.

*d. Acrofilicitatea,* adică accesibilitatea lor la structurile de recunoaştere imună ale organismului (anticorpi, receptori pentru antigen etc.)

*e. Amfipaticitatea,* care defineşte periodicitatea regiunilor hidrofile şi hidrofobe.

De obicei, unele reziduuri de aminoacizi, din cele 5-6 care formează un epitop continuu, pot fi înlocuite cu altele fără ca această înlocuire să influenţeze hotărâtor imunogenitatea peptidei respective (fig.4). Acest fapt sugerează că peptida liniară este de fapt discontinuă din punct de vedere antigenic, iar distincţia dintre "continuu" şi "discontinuu", din punct de vedere imunologic, este artificială. Dacă este aşa, atunci înseamnă că numărul minim necesar pentru realizarea recunoaşterii specifice a epitopului de către paratop ar fi de 1-2 aminoacizi. Aceasta sugerează că de fapt, "recunoaşterea imunologică" nu este altceva decât o "recunoaştere chimică".

Utilizarea ca sonde antigenice de segmente scurte, care corespund unor fragmente proteice, permite identificarea epitopilor din regiunile "mobile" iar a segmentelor lungi, a celor din regiunile mai puţin mobile ale proteinelor. De regulă, între epitop şi paratop se pot stabili o serie de contacte, peptidele cu dimensiuni mai mari fiind capabile să adere la diferite subregiuni ale paratopului. În prezent se folosesc o serie de tehnici pentru localizarea epitopilor pe molecula de antigen, unele dintre ele fiind redate în tabelul 2.

**Metode uzuale folosite pentru localizarea epitopilor la nivelul unei molecule de antigen (după M.H.V.Van REGENMORTEL)**

| Metoda folosită | Tipul epitopului recunoscut | Criteriul pentru identificarea reziduului implicat |
|---|---|---|
| Cristalografie în raze X a complexului antigen-anticorp | Epitop discontinuu care reacţionează cu anticorpul omolog | Contact la interfaţa epitop-paratop |
| Folosirea fragmentelor de peptide ca probe antigenice de reacţie încrucişată:<br>1. Peptide liniare<br>2. Peptide adsorbite pe faze solide<br>3. Peptide conjugate la grupări purtătoare<br>4. Peptide ataşate la suportul folosit pentru sinteză | Epitopi continui care reacţionează încrucişat cu anticorpi heterologi. | Legarea reziduală a fragmentelor liniare |
| Identificarea reziduurilor critice în fragmentul de peptidă prin studii de înlocuire sistematică | Epitopi continui conţinând reziduuri esenţiale, răspândite printre reziduuri irelevante | Abrogarea reactivităţii încrucişate după înlocuirea reziduului funcţional esenţial |
| Utilizarea de anticorpi antipeptidici | Epitopi continui care reacţionează încrucişat cu anticorpii heterologi | Inducerea de anticorpi care reacţionează încrucişat |

După cum spuneam, gruparea purtătoare poate "purta" un singur tip de epitop sau un număr multiplu de epitop, cu una sau mai multe specificităţi antigenice. Pentru fiecare dintre acestea, în populaţia de celule limfoide există un corespondent reprezentat de un număr restrâns de celule (clonă) de limfocite, care exprimă pe suprafaţa lor receptori unici şi specifici. În general, antigenele de natură proteică au câte un epitop la fiecare 5 kD greutate şi leagă un număr variabil de situsuri combinative, adică au valenţe variabile în funcţie de greutatea lor moleculară. Astfel, hemoglobina cu greutatea moleclară de 32 kD are 6 valenţe, adică fixează 6 situsuri combinative, mioglobina cu greutate de 17 kD are 3 valenţe, iar cea cu greutatea de 40 kD tot trei valenţe, fapt care sugerează că molecula mare, de 40 kD, are o parte din epitopi "ascunşi" în interiorul ei. Determinanţii antigenici pot avea uneori o suprafaţă mai mare decât situsul combinativ al moleculei de anticorp. Anticorpii recunosc şi se fixează pe epitop, deoarece acesta a fost partea de moleculă care a selectat clona cu receptori pentru el şi a activat funcţiile ei în vederea sintezei lor. În afară de specificitatea pentru determinantul antigenic există şi o specificitate pentru gruparea purtătoare, denumită şi "specificitate carrier". Astfel, dacă unui animal i se inoculează un antigen format din gruparea purtătoare A şi epitopul B, anticorpii formaţi vor recunoaşte epitopul B. După al doilea stimul antigenic cu complexul AB, adică cu aceeaşi grupare purtătoare şi acelaşi epitop, titrul lor va creşte. Dar va creşte şi atunci când stimulul secundar s-a făcut cu acelaşi epitop ataşat însă la o altă grupare purtătoare, de exemplu X, complexul inoculat fiind de data aceasta XB. Dacă însă, stimulul secundar se face cu gruparea purtătoare A, care nu poartă epitopul B ci un alt epitop, cum ar fi de

pildă Y, atunci sinteza anticorpilor anti-B nu va mai avea loc, existând tendinţa formării de anticorpi anti-Y şi, în foarte modestă măsură, şi a unor anticorpi anti-B. Acest fapt sugerează că celulele recunosc o suprafaţă din molecula de antigen ceva mai mare decît suprafaţa epitopului, şi anume o porţiune mică din componenţa grupării purtătoare dir imediata vecinătate a acesteia (fig.5).

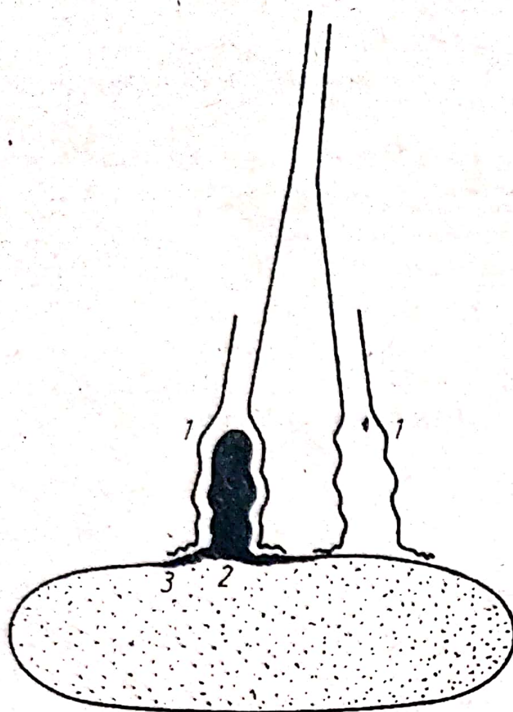



Fig.5. Molecula de anticorp, prin situsul său combinativ (1), recunoaşte specific epitopul (2) de pe gruparea purtătoare dar, pe lângă acesta, mai recunoaşte şi o porţiune foarte mică din alcătuirea grupării purtătoare (3).

## FACTORII CARE INFLUENŢEAZĂ SPECIFICITATEA ANTIGENICĂ

Specificitatea este influenţată nu numai de către compoziţia chimică a moleculei, dar şi de conformaţia ei sterică, adică de poziţia în spaţiu a epitopilor sau chiar a unor atomi din componenţa acestora. Acest fapt devine evident atunci când pentru imunizări se folosesc substanţe identice din punct de vedere chimic, dar cu izomerism optic diferit. De exemplu, receptorii pentru antigen de la nivelul celulei limfoide pot distinge epitopi identici care diferă între ei doar printr-o simplă inversiune între poziţia unui atom de hidrogen şi o grupare OH, legate la acelaşi atom de carbon. Este cazul glucozei şi galactozei, care se deosebesc din punct de vedere antigenic numai prin poziţia în spaţiu a grupărilor H şi OH la atomul de C nr. 4. Specificitatea antigenică determinată de conformaţia sterică poate influenţa atât sinteza şi aviditatea anticorpilor, cât şi receptivitatea receptorilor pentru antigen de pe suprafaţa limfocitelor *B* sau *T*. De exemplu, iepurii imunizaţi cu albumină serică de cobai conjugată în poziţia *orto-*, *meta-* sau *para-*, cu azobenzen, sulfat, fac forme de sensibilizare specifică fiecărui izomer optic, putând fi desensibilizaţi total numai cu izomerul respectiv, utilizarea celorlalţi izomeri realizând doar o desensibilizare parţială. Aşadar, atât imunogenitatea cât şi specificitatea antigenică a moleculei sunt determinate de "epitop", o porţiune mică dar activă din moleculă, cu suprafaţa de 7-8 m $\mu^2$ şi greutatea de cca. 0,35-1,0 kD. Partea de moleculă pe care sunt fixate grupările determinante, adică partea care le "poartă", contribuie la recunoaşterea antigenului de către limfocitele *T* şi la declanşarea răspunsului imun specific. De fapt, specificitatea antigenelor naturale şi în special a proteinelor de origine animală este multiplă, putând exista *specificităţi de specie, de grup, de organ* etc.

**Specificitatea antigenică de specie sau izoantigenică** (gr. *isos*=acelaşi). Membrii unei specii au antigene specifice speciei lor, care nu există la alte specii. Aşa se face că antigenele de pe suprafaţa eritrocitelor, leucocitelor, muşchilor striaţi, moleculelor de albumină, imunoglobină etc., se deosebesc de cele existente la nivelul organelor, celulelor sau moleculelor analoage ale altor specii. Acest

gen de specificitate se numeşte "specificitate de specie" sau "specificitate izotipică" şi este comună tuturor membrilor speciei.

**Specificitatea de grup sau "alotipică"** (gr. *allos*=diferit) este caracteristică numai unor grupe de indivizi şi nu tuturor membrilor unei specii. Aceste antigene particulare, cu specificitate de grup, se numesc "aloantigene" şi se întâlnesc în special la nivelul celulelor sistemului limfoid şi pe lanţurile grele ale moleculelor de imunoglobulină. La nivelul eritrocitelor umane ar exista cca. 100 de determinanţi antigenici diferiţi, grupaţi în 20 de sisteme aloantigenice. Şi la celulele prokariote este cunoscută deosebirea antigenică de specie şi de grup. De exemplu, atât stafilo-cocii cât şi salmonelele au deteminanţi antigenici care pot fi situaţi la diferite nivele ale celulei (fig. 6) şi care au specificitate de specie, imunoglobulinele, cu funcţie de anticorpi faţă de ei, putând face uşor distincţia între cele două specii, în sensul că anticorpii antisalmonele aglutinează salmonele şi nu stafilococi, iar cei anti-stafilococici aglutinează în exclusivitate aceste bacterii şi nu altele. Dar în cadrul aceleiaşi specii există specificităţi de grup sau, conform denumirii uzuale, specificităţi serologice de "tip" (serotip) care permit distincţia între diferite grupe de germeni. Aceeaşi situaţie este şi la virusuri, unde specificităţile de grup pot fi foarte limitate ca număr, cum este cazul virusului variolic, sau foarte numeroase, cum este cazul virusului gripal. Determinarea serotipurilor bacteriilor şi virusurilor patogene are o mare importanţă practică, în special pentru epidemiologie.

**Specificitatea de organ** este caracteristică unor organe sau ţesuturi fără să ţină cont de specie. De exemplu, există unele organe cum ar fi ficatul, cristalinul etc, cu determinanţi antigenici specifici lor, care nu sunt prezente la nivelul altor organe ale aceluiaşi organism, dar care se găsesc exprimaţi pe cristalinul sau ficatul indivizilor aparţinând altor specii.

**Specificitatea de "stadiu evolutiv" sau de "dezvoltare ontogenică".** Caracterizează majoritatea celulelor organismului şi în mod special pe cele care aparţin sistemului limfoid. De pildă, limfocitele *T* aflate în stadii timpurii de dezvoltare ontogenică exprimă unii epitopi care dispar atunci când celulele ajung la maturitate funcţională. La nivelul ţesuturilor şi lichidelor embrionare, există alfa-fetoproteina (AFP), un antigen specific acestui stadiu de dezvoltare timpurie a organismului, care la vârsta maturităţii practic dispare, reapărând numai în cazuri patologice, ca de pildă în distrofiile şi neoplaziile hepatice. Deci, există şi specificităţi antigene patologice, care în mod normal lipsesc. Un interes deosebit din acest punct de vedere îl prezintă "antigenele neoplazice" sau "onco-fetale", cum ar fi antigenul carcinoembrionar (CEA) sau AFP amintită anterior. La subiecţii



Fig.6. Localizări posibile ale determinanţilor antigenici la nivelul unei celule prokariote (bacterii). 1- peretele bacterian; 2 - membrana celulară; 3 -citoplasma; 4 - fimbrii sau cili, filamente. Imagine la microscopul electronic cu transmisie directă a bacteriei *Klebsiella pneumoniae* mărită x 24 000 (fotografie realizată de către dr. Alexandru Petrovici).

sănătoşi, aceste antigene se găsesc în cantităţi extrem de mici, de ordinul picogramelor sau nanogramelor, pentru ca la pacienţii cu cancer de colon sau cu leziuni hepatice, de pildă, să fie exprimate abundent atât în ser cât şi la nivelul unor ţesuturi sau organe.

## ANTIGENE HETEROFILE

Antigenele heterofile se găsesc exprimate la nivelul ţesuturilor membrilor unor specii diferite şi foarte îndepărtate filogenetic. Un exemplu tipic sunt antigenele *Forssman,* existente la mamifere, reptile, peşti, bacterii şi chiar la unele plante. Animalele care posedă antigenele Forssman se numesc *Forssman pozitive,* iar cele lipsite de aceste antigene sunt *Forssman negative.* Dacă se inoculează ţesuturile unui animal Forssman pozitiv altuia Forssman negativ, se obţin anticorpi faţă de aceste heteroantigene care reacţionează atât cu ţesutul animalului donator cât şi cu ţesuturile animalelor aparţinând unor specii foarte îndepărtate din punct de vedere evolutiv. În tabelul 3 sunt menţionate unele specii de vertebrate Forssman negative şi pozitive.

*Tabelul 3*

**Specii de vertebrate Forssman negative şi pozitive**

| Forssman negative | Forssman pozitive |
|---|---|
| Om (cu excepţia grupului A) | Om (numai cei cu grupa A) |
| Cobai (cu excepţia rinichiului) | Cobai (numai rinichiul), cal, vulpe, şoarece, leu |
| Cimpanzeu, gorilă, iepure, şobolan, bovine, raţe | Tigru, câine, lup, pisică, cămilă, capră, oaie |

Forssman pozitive sunt şi unele specii bacteriene, cum ar fi germenii din speciile *Salmonella, Shighella, Pasteurella, Clostridium, Neisseria, Pneumococcus* etc. În afară de antigenele Forssman, există şi alte antigene heterofile. Este cazul antigenelor *Rh* prezente pe ţesuturile maimuţei *Macacus rhesus* şi omului, la specia umană aceste antigene fiind "de grup", deoarece sunt indivizi $Rh^+$ care le exprimă pe suprafaţa eritrocitelor şi indivizi $Rh^-$ care nu le exprimă. Există heteroantigene comune unor specii de mamifere şi unor bacterii, cum este cazul celor prezente pe eritrocitele umane de grup *0* şi pe agentul etiologic al ciumei umane (*Pasteurella pestis*) sau pe eritrocitele de grup *A* şi virusul variolic. *Escherichia coli,* serotip $0_{86}$, are un determinant antigenic comun cu aglutinogenul *B* din sistemul *ABO* uman, iar polizaharizii pneumococului serotip XIV au un antigen comun cu aglutinogenul *A* din acelaşi sistem. În serul oamenilor bolnavi de tifos exantematic apar aglutinine care reacţionează cu *Proteus* OX19 iar, serul celor cu mononucleoză infecţioasă reacţionează cu antigenele termostabile ale eritrocitelor de oaie. Existenţa heteroantigenelor poate fi utilă, dar poate crea şi multe dificultăţi. De exemplu, antigenele comune rickettsiilor şi proteusului stau la baza unor teste de laborator extrem de utile pentru diagnosticul tifosului exantematic (reacţia Weil-Felix) sau mononucleozei infecţioase (reacţia Paul-Bunell). Dar sunt şi numeroase efecte negative. Astfel, oamenii cu antigene de grup 0 sau A reacţionează mai slab la antigenele unor germeni cum ar fi pasteurelele sau virusul vaccinal, putând constitui în zonele

endemice de pestă sau variolă (înainte de eradicarea ei) adevărate rezervoare naturale. Organismele mamiferelor care au determinanţi comuni cu cei ai bacteriilor sau virusurilor patogene pot să nu reacţioneze imun, instalându-se toleranţa imunologică faţă de acestea, sau în cazul în care reacţionează, anticorpii produşi vor distruge în cele din urmă şi antigenele proprii, comune cu cele ale agentului invadator, provocând boli autoimune. Existenţa de antigene comune poate genera reacţii imune încrucişate şi în final autoagresiune. De exemplu, streptococul de grup A are antigene comune cu ţesutul conjunctiv şi cu muşchiul cardiac al omului, persoanele cu infecţii streptococice îmbolnăvindu-se de reumatism sau endocardite.

**Valenţa antigenelor**. Prin acest termen, împrumutat din chimie, se înţelege numărul de epitopi exprimaţi care pot reacţiona cu situsurile combinative ale moleculelor de anticorpi. Aşadar, o moleculă de antigen poate reacţiona cu un număr de situsuri combinative egal cu numărul de determinanţi antigenici pe care-l exprimă sau, altfel spus, valenţa unui antigen este valoarea dublă a moleculelor de anticorpi din clasa IgG cu care poate reacţiona (trebuie să se ţină cont că o moleculă de anticorp IgG are două situsuri combinative şi deci, poate "lega" doi determinanţi antigenici).

Determinarea valenţei antigenelor se face prin reacţii imunochimice de precipitare în exces de molecule de anticorp. Metoda nu este foarte exactă, mai ales în cazul antigenelor cu greutate moleculară mică, dar totuşi este încă folosită. Cu ajutorul ei s-a stabilit că, în medie, o moleculă de antigen are 10-20 de epitopi, adică 10-20 de valenţe şi că, cu cât molecula este mai mare, cu atât şi valenţele ei sunt mai numeroase. De exemplu, ribonucleaza cu greutatea moleculară de 13 kD are trei valenţe, toxina difterică de 72 kD are 8, iar hemocianina (extrasă din crustaceul *Meghatura crenulata*), care are o greutate moleculară mare, are 231 de valenţe – adică 231 de epitopi pe moleculă.

## TIPURI DE ANTIGENE ŞI CRITERII DE CLASIFICARE A LOR

Toate substanţele obţinute din bacterii, virusuri, animale vertebrate sau nevertebrate, din plante, precum şi cele obţinute artificial şi sintetic, care au calitatea de antigen, au două atribute majore şi anume: a) capacitatea de a declanşa reacţii imune şi b) proprietatea de a reacţiona specific cu anticorpii sau receptorii pentru antigen de pe suprafaţa limfocitelor *T* sau *B*. Dar, nu toate antigenele deţin întotdeauna aceste două atribute majore. Unele pot declanşa reacţii imune şi pot reacţiona *in vitro* cu produşii acestor reacţii, respectiv cu anticorpii, cu care dau precipitate sau aglutinate vizibile, din care cauză au fost denumite "antigene complete". Altele pot reacţiona *in vitro* cu anticorpii, dar nu pot induce sinteza lor *in vivo* deoarece sunt molecule foarte mici. Acestea au fost denumite *haptene* (gr. *haptein* = a prinde, a atinge). Haptenele care dau reacţii de precipitare cu anticorpii vizibile sunt *haptene complete*, iar cele care nu dau reacţii vizibile sunt *incomplete*. Aceasta a fost una dintre primele încercări de clasificare a antigenelor.

Ulterior au fost adoptate şi alte criterii (tabel 4; fig.7). Se pare că cea mai corectă clasificare este cea care ţine cont de clasele de celule care pot fi stimulate de către antigen, respectiv de limfocitele *T* şi *B*. Pe baza acestui criteriu, antigenele sunt *timo-dependente,* adică necesită pentru recunoaşterea lor prezenţa limfocitelor *T* şi *timo-independente*, care pot stimula limfocitele B şi în absenţa celulelor *T*.

Tabelul 4

**Diverse criterii de clasificare a antigenelor**

| Criteriul de clasificare | Caracteristici | Proprietăţi funcţionale |
|---|---|---|
| Capacitatea de a induce reacţii imune şi de a reacţiona cu produşii acestor reacţii (anticorpi) *in vitro* | Antigene complete | Induc reacţii imune *in vivo*<br>Reacţionează cu anticorpii *in vitro* |
| | Haptene complete | Nu induc reacţii imune *in vivo*<br>Formează cu anticorpii precipitate vizibile |
| | Haptene incomplete | Nu induc reacţii imune *in vivo*<br>Reacţionează cu anticorpii *in vitro*, dar nu formează precipitate vizibile |
| Modul de formare | Naturale | Toate antigenele care există în natură |
| | Artificiale | Obţinute artificial în laborator, prin iodurare, diazotare, dinitrofenilare, cuplare cu acid tartric etc. |
| | Sintetici | Obţinute sintetic prin asocierea deliberată a aminoacizilor sub formă de:<br>- Homopolimeri<br>- Heteropolimeri<br>- liniari<br>- ramificaţi |
| Originea antigenelor | Animale | Diverse proteine, glicoproteine care formează antigenele de histocompatibilitate, de grup sangvin, enzimele, hormonii etc.<br>Lipoproteine, glicolipide, acizi nucleici etc. |
| | Vegetale | Proteine, glicoproteine etc. |
| | Bacteriene, virale | Proteine , glicoproteine, lipopolizaharizi, polizaharizi etc. care intră în componenţa peretelui, capsulei, flagelilor, cililor |
| Specificitatea în raport cu specia proprie sau alte specii | De organ | Proprii unor organe ca ficat, rinichi, pulmon etc. care aparţin indivizilor unor specii diferite de mamifere |
| | De specie | Proprii tuturor indivizilor, aparţinând unor specii de animale, plante, paraziţi, bacterii etc. |
| | Heteroantigene | Antigene existente la indivizii unor specii îndepărtate filogenetic |

| Criteriul de clasificare | Caracteristici | Proprietăţi funcţionale |
|---|---|---|
| Sursa antigenelor | Externă | Provin din afara organismului (majoritatea antigenelor) |
| | Internă | Se formează în interiorul organismului prin denaturarea sau îmbătrânirea structurilor proprii |
| În raport cu condiţia "normal" | Normale | Există în mod normal la nivelul ţesuturilor, celulelor şi umorilor organismului |
| | Patologice | Nu există în mod normal în organism în cantităţi decelabile, sinteza lor făcându-se numai în condiţii patologice |
| Gradul de înrudire genetică | Autohton (autolog) | Proprii unui individ |
| | Singen (izolog) | Antigenele provin de la indivizi aparţinând aceleiaşi specii, identici între ei din punct de vedere genetic (inbred sau consangvini) |
| | Alogen (omolog) | Provin de la subiecţii aceleiaşi specii, dar diferiţi între ei sub raport genetic |
| | Xenogen (heterolog) | Provin de la subiecţii aparţinând unor specii diferite |
| După modul de reacţie cu anticorpii | Precipitinogeni | Antigene (molecule) precipitate de către anticorpi |
| | Aglutinogeni | Sunt exprimate pe suprafaţa unor celule prokariote sau eukariote (bacterii, hematii, leucocite etc). În prezenţa anticorpilor, celulele aglutinează |
| Intensitatea răspunsului imun | "Slabe" | Slab imunogene |
| | "Tari" | Intens imunogene |
| Capacitatea de multiplicare | Nu se multiplică | Molecule (proteine, glicoproteine) sau celule inactivate |
| | Se multiplică | Virusuri, bacterii, paraziţi, celule normale sau tumorale care se pot multiplica în interiorul organismului gazdă |
| În funcţie de necesitatea prezenţei limfocitelor *T* | Timo-dependente | Pentru a declanşa reacţii imune au nevoie de prezenţa limfocitelor *T* (majoritatea antigenelor existente în natură) |
| | Timo-independente | Nu necesită prezenţa limfocitelor *T*, putând stimula direct limfocitele *B*. Sunt relativ puţine (flagelina polimerizată, endotoxinele, polivinil-pirolidona etc), având epitopi care se succedă repetitiv |

| Criteriul de clasificare | Caracteristici | Proprietăţi funcţionale |
|---|---|---|
| În funcţie de necesitatea de a fi prelucrată molecula de către celulele APC (prezentatoare de antigen) | Tipul I | Nu necesită nici un fel de prelucrare (fibrinogenul, proteinele *Listeriei monocytogenes)* |
| | Tipul II | Nu necesită ruperea moleculei, ci doar desfacerea (desfăşurarea) ei şi evidenţierea epitopilor (lizozim, mioglobină, ribonuclează) |
| | Tipul III | Necesită degradarea moleculei (ovalbumină, citocrom *c* etc.) |

Fig.7. Clasificarea antigenelor după gradul de înrudire genetică a lor. 1 - antigene "autohtone" sau "autologe", proprii unui individ; 2 - antigene" singene" sau "izologe", care aparţin unor indivizi identici din punct de vedere genetic (gemeni univitelini sau şoareci cosangvini); 3 - antigenele "alogene" sau "omologe" aparţin indivizilor aceleiaşi specii dar diferiţi între ei din punct de vedere genetic; 4 - antigenele "xenogene" sau "heterologe" aparţin subiecţilor care fac parte din specii diferite.

După provenienţa lor antigenele sunt *naturale, artificiale şi sintetice.*

## ANTIGENE NATURALE

Antigenele naturale, adică cele care se găsesc ca atare în natură, sunt proteinele, lipidele, polizaharizii, acizii nucleici sau glicoproteinele, glicolipidele, lipopolizaharidele (LPS) etc.

### PROTEINELE

Proteinele naturale sau cele modificate fizic sau chimic sunt de regulă bune antigene; lanţurile polipeptidice scurte şi histonele sunt slab antigenice. Deci, pentru imunogenitate, importanţa majoră au lungimea lanţului, secvenţa primară a aminoacizilor precum şi reziduul aminoacidului terminal. Lanţurile polipeptidice scurte nu sunt imunogene; dar neimunogene sunt şi cele lungi, alcătuite din unul sau doi aminoacizi.

Pentru a fi imunogene este necesar ca în structura primară a lanţului să existe minimum 3-4 reziduuri diferite de aminoacizi, care să înşiruie pe o lungime corespunzătoare capabilă să confere moleculei o conformaţie sterică particulară. Aminoacidul terminal nu are rol esenţial în asigurarea imunogenităţii moleculei, dar este hotărâtor în determinarea specificităţii ei antigenice. Proprietăţi antigenice au proteinele serice (albumina, alfa-, beta- şi gammaglobulinele), proteinele din componenţa celulelor şi

ţesuturilor, hormonii, enzimele etc. Unele dintre acestea au o importanţă majoră. Este cazul antigenelor de histocompatibilitate (MHC) care conferă individualitate antigenică ţesuturilor fiecărui individ din cadrul aceleiaşi specii, antigenelor de grup sanguin (sistemele *ABO*, *Rh* etc.), al unor antigene ce la nivelul membranei plasmatice a celulelor sistemului imun care sunt "markeri" pentru acestea etc. În afară de aceste antigene "normale", în tumorile induse chimic sau viral se pot forma antigene noi, diferite de cele prezente în mod normal la nivelul ţesuturilor din care s-a dezvoltat procesul neoplazic. Din cauza capacităţii lor de a genera răspuns imun care să realizeze rejecţia tumorii transplantate la alţi indivizi din cadrul aceleiaşi specii, aceste antigene au fost denumite "antigene de transplantare specific tumorale" sau TSTA (Tumor Specific Transplantation Antigens). Ele sunt recunoscute ca non-proprii de către gazda primară deoarece la nivelul celulei neoplazice pot apărea determinanţi antigenici noi, care să fie recunoscuţi de către efectorii sistemului imun şi să se inducă rejecţia (eliminarea) tumorii (TAA=Tumor Associated Antigens).

Este posibil ca genele care codifică antigenele MHC să fie implicate şi în sinteza şi exprimarea antigenelor TAA, între aceste două tipuri de antigene, respectiv între cele THC şi TAA, existând relaţii genetice, structurale şi funcţionale. La rozătoare s-a dovedit că antigenele TSTA din celulele leucemice sunt de fapt un înveliş glicoproteic recombinat al virusurilor leucemiei cu greutate moleculară mică. Până în prezent nu s-a putut demonstra existenţa unor antigene specific tumorale şi la nivelul tumorilor spontane, neinduse chimic sau viral, cu excepţia melanomului cutanat malign la om, la nivelul căruia, cu ajutorul anticorpilor monoclonali, au putut fi puse în evidenţă astfel de antigene.

## POLIZAHARIDELE

Polizaharidele se găsesc sub formă de poliozide liniare sau ramificate, în care un monozaharid este legat de alt monozaharid în lanţ liniar sau ramificat, ramificaţie care, fie că porneşte lateral de la un lanţ central liniar, fie că porneşte de la un punct central fără nici o simetrie. Lanţul specific lateral, precum arată şi denumirea, conferă specificitate antigenică moleculei. Polizaharidele purificate au putere imunogenă slabă, unele dintre ele (acidul hialuronic) fiind chiar neimunogene sau imunogene doar pentru unele specii de animale. De exemplu, polizaharidul de tip III din capsula pneumococului este imunogen pentru şoarece şi om, dar nu şi pentru iepure sau cobai. Dextranii, cu greutate moleculară mare ($10^4$ - $10^5$ kD) secretaţi de către *Leuconostoc mesenteroides,* alcătuiţi numai din unităţi de glucoză, sunt în anumite condiţii imunogene pentru şoarece, dar nu şi pentru iepure. În combinaţii moleculare cu lipidele şi proteinele, stimulează formarea de anticorpi cu specificitate faţă de hidraţii de carbon.

## LIPIDELE

Lipidele sunt slab antigenice dar pot avea calităţi de haptene, mai ales atunci când sunt cuplate cu anumite proteine, situaţie în care se pot obţine anticorpi anti-colesterol, -lecitină, -cefalină etc.

Mai bine studiate sunt proprietăţile antigenice ale cardiolipinei, o haptenă utilizată în reacţia Wasserman, reacţie princeps în diagnosticul serologic al sifilisului. Cardiolipina, destul de răspândită în ţesutul animalelor, plantelor sau chiar celulelor bacteriene, reacţionează pozitiv numai cu anticorpii oamenilor

infectaţi cu *Treponema pallidum*. Lipidele conferă proprietăţi antigenice şi funcţionale lipopolizaharidelor (LPS), endotoxinelor germenilor Gram-negativi etc.

## ACIZII NUCLEICI

Acizii dezoxiribonucleici (ADN) şi ribonucleici (ARN) sunt macromolecule slab imunogene în mod obişnuit, dar pot induce sinteza de anticorpi atunci când formează complexe cu unele polizaharide sau proteine. Dovada imunogenităţii lor este dată de existenţa anticorpilor anti- ADN mono- sau dublucatenar, în lupusul eritematos sistemic uman sau murin, boală caracterizată printr-o hiperproducţie de anticorpi faţă de diverse antigene celulare proprii.

## LIPOPOLIZAHARIDELE

Lipopolizaharidele (LPS) sunt complexe macromoleculare din componenţa peretelui celular al germenilor Gram-negativi, alcătuite din fosfolipide şi polizaharide. Complexul se leagă de structura rigidă a peretelui bacterian prin lipidul A, care la rândul său leagă un segment CORE format din L-glicero-D-Mano-Heptoză (HEP) şi acidul ceto-3-deoxi-D-monoacetonic (KDO) fosforilat (fig.8). În acest complex, lipidul A este regiunea care conferă proprietăţi endotoxice şi biologice moleculei, dintre care cele mai cunoscute sunt toxicitatea, pirogenitatea, proprietatea de activator policlonal pentru limfocitele *B* de şoarece, de stimulator al funcţiilor macrofagelor etc., fiind în general responsabil de activarea sau supresia unor funcţii imune. Ca şi în cazul altor antigene şi în cazul LPS au fost semnalate susceptibilităţi diferite, condiţionate de specia sau de caracterul genetic al animalelor inoculate. De exemplu, limfocitele şoarecilor CH3/HeJ nu reacţionează *in vitro* la stimuli cu LPS, deoarece sunt lipsite de receptori pentru acest complex molecular. Limfocitele *B* ale celorlalte tulpini de şoarece au receptori pentru LPS şi proliferează policlonal *in vitro* sub acţiunea acestuia.

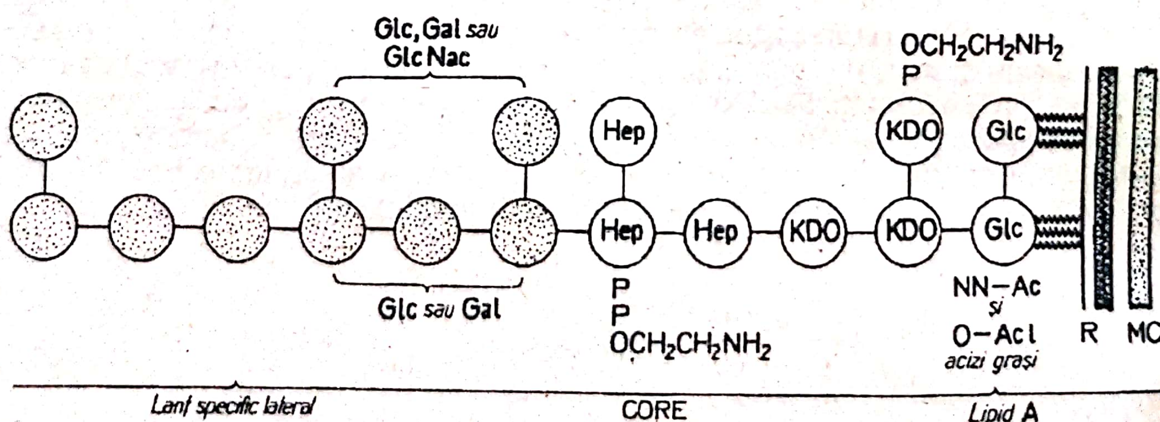



Fig.8. Structura chimică a unei molecule de lipopolizaharid bacterian (LPS). Lipidul A leagă, la structura rigidă (R) de la exteriorul membranei celulare (MC) a germenilor Gram-negativi, complexul glucidic CORE format din molecule de glucoză (Glc), galactoză (Gal) sau N-acetilgalactozamină sau N-acetil glucozamină (Gal-Nac sau Glc-Nac) şi lanţul lateral la nivelul căruia se găseşte antigenul polizaharidic.

Sunt antigene ubicuitare, prezente la animale, bacterii şi în special la plante. Sunt proteine sau glicoproteine care leagă diferite molecule de hidraţi de carbon (tabelul 5), specificitatea lor pentru aceste molecule făcând din ele instrumente larg utilizate în cercetările de imunochimie şi imunologie celulară, cu referire specială la studiul glicoconjugatelor de pe membrana limfocitelor.

*Tabelul 5*

**Specificitatea pentru hidraţii de carbon a unor lectine**

| Sursa lectinei şi denumirea ei | Denumirea comercială | Termen prescurtat | Specificitatea pentru HdC |
|---|---|---|---|
| Plante | | | |
| *Phaseolus vulgaris* | Phytohaemagglutinin | PHA | D-GalNac |
| *Phytolacca americana* | Pokeweed mitogen | PWM | D-GalNac |
| *Canavalia ensiformis* | Concavalina A | ConA | D-Man; D-Glc |
| *Lens culinaris* | Lentil lectin | LC | Man;Glc |
| *Arachis hypogaea* | Peanut agglutinin | PNA | Gal; GalNac |
| *Ricinus communis* | Castor bean | RCA2 | GalNac |
| *Vicia villosa* | Vicia villosa lectin | - | D-GalNac |
| *Glycine maxima* | Soybean germ agglutinin | SGA | D-GalNac |
| *Triticum vulgaris* | Wheat germ agglutinin | WGA | GalNac; D-GalNac |
| Animale | | | |
| *Helix pomatia* | Helix pomatia agglutinin | - | D-GalNac |
| *Limulus polyphemus* | Horseshoe craw | - | NANA |
| Bacterii | | | |
| *Escherichia coli* | - | - | Man |
| *Salmonella typhimurium* | - | - | Man |
| *Pseudomonas aeruginosa* | - | - | Gal |

Gal=galactoză; GalNac=N-acetil galactozamină; Glc=glucoză; GlcNac=N-acetil glucozamină; HdC=hidraţi de carbon; NANA=acid N-acetil neuraminic; Man=manoză.

Asupra limfocitelor exercită diferite efecte, ca de pildă leucoaglutinare, blastogeneză, stimularea eliberării unor mediatori sau proteine efectoare etc, acestea având la nivelul membranei cca. $10^6$ - $10^7$ receptori pentru diferite lectine. Prezenţa acestor receptori şi recunoaşterea diferenţiată a diferitelor tipuri de celule, permite separarea şi studierea unor populaţii ale sistemului imun. De exemplu, se pot separa monocitele de limfocite prin aglutinarea cu *peanut agglutinin* (PNA), o lectină extrasă din arahide, sau eritrocitele de şoarece de limfocite, prin aglutinare cu concanavalină (ConA) etc. Unele lectine aglutinează selectiv celulele tumorale, cum ar fi RCA, RNA, WGA, LA etc, fiind folosite ca markeri pentru acestea.

Capacitatea diferită de legare la celulele tumorale s-ar datora unei creşteri a numărului de situsuri de legare pe membrana acestora, modificării mobilităţii

acestor situsuri sau unor modificări morfologice ale membranei, care evidenţiază hidraţii de carbon de la nivelul dublului strat lipidic al ei. Fixarea lectinelor la receptorii celulari este un proces energo-dependent solicitând anumite condiţii de temperatură şi este urmată, în cazul celor cu potenţial de stimulare a blastogenezei, de mitoză şi proliferare celulară policlonală. Datorită greutăţii moleculare mari (fitohemaglutina are de exemplu 140 kD), lectinele sunt în general bune imunogene.

### ANTIGENE TIMO-DEPENDENTE ŞI TIMO-INDEPENDENTE

Antigenele timo-dependente sunt larg răspândite în natură şi solicită, în cazul celor timo-dependente, participarea limfocitelor *T* ajutătoare pentru a putea stimula celelalte celule (limfocitele *B*). De regulă, sunt molecule nepolimerizate deosebindu-se de antigenele timo-independente care nu necesită participarea limfocitelor *T*, sunt molecule polimerizate şi au numeroase grupări determinate care se succedă repetitiv, monoton, pe suprafaţa lor şi care nu necesită participarea limfocitelor *T* la declanşarea răspunsului imun. Se cunosc puţine antigene timo-independente (polivinil pirolidona, flagelina polimerizată, dextranul, endotoxinele germenilor Gram-negativi, polizaharizii pneumococici), cvasitotalitatea antigenelor din natură fiind timo-dependente.

### ANTIGENE DE TIP I, II ŞI III

După modul cum sunt prelucrate după fagocitarea lor de către celulele prezentatoare de antigen (APC) antigenele pot fi de tip I, care nu suferă nici o modificare a moleculei, de tip II – la care este suficientă o simplă desfăşurare a structurilor secundare sau terţiare a moleculei pentru a se evidenţia epitopii – şi de tip III care necesită fragmentarea, ruperea moleculei în bucăţi, cu expunerea la suprafaţa fragmentelor a epitopilor. Figura 9 redă schematic aceste trei tipuri de antigene.

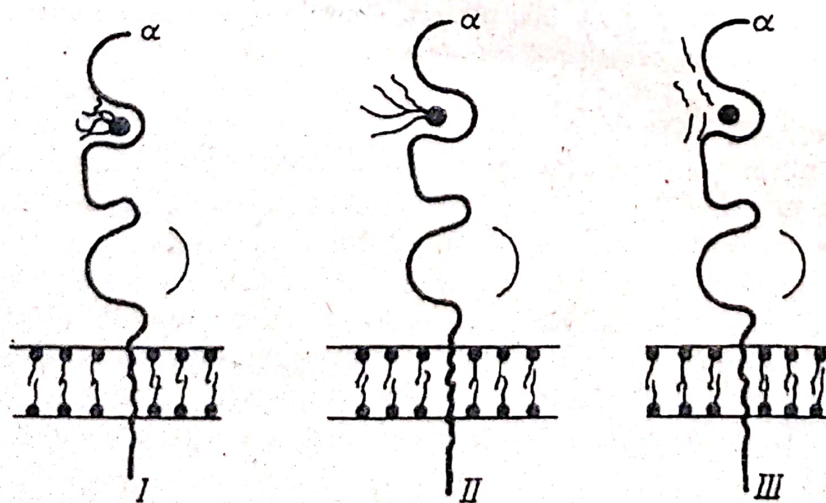



Fig.9. Clasificarea antigenelor după modul lor de "prelucrare" de către celulele fagocitare: antigenele de tip I nu sunt prelucrate, fiind exprimate ca atare pe lanţul $\alpha$ al MHC de pe celula prezentatoare de antigen; antigenele de clasa II sunt "desfăşurate", iar cele de clasa III sunt fragmentate de către celula fagocitară.

Sursa majoră de antigene, care deţin un rol deosebit în reacţiile imune, respectiv în declanşarea lor, sunt organismele vii: virusuri, bacterii, nevertebrate, vertebrate. Ele au rol atât în realizarea protecţiei antiinfecţioase sau antiparazitare, cât şi în imunitatea de transplantare sau antineoplazică.

## Antigenele bacteriene şi virale

Celulele prokariote (virusurile şi bacteriile) conţin numeroase antigene care diferă între ele nu numai din punct de vedere al localizării lor sau al compoziţiei chimice, dar şi din punct de vedere al imunogenităţii. În alcătuirea lor există proteine, glicoproteine, glicolipide, lipopolizaharizi, acizi nucleici, care au specificitate de specie sau specificitate de grup. Antigenele bacteriene diferă şi din punct de vedere al greutăţii lor moleculare. De exemplu, greutatea moleculară a proteinei virusului mozaicului tutunului este de 17000 kD, enormă în comparaţie cu alte proteine sau nucleoproteine. O importanţă particulară atât pentru patogenitatea cât şi pentru antigenitatea microorganismelor o au polizaharizii şi lipopolizaharizii existenţi predominant în capsula şi peretele celular al majorităţii speciilor bacteriene.

În comparaţie cu proteinele, polizaharizii sunt mai puţin antigenici atât pentru om, cât şi pentru iepure şi cobai, iar diferenţele de antigenitate a lor, în funcţie de specia bacteriană şi de provenienţă sunt mai mici decât cele existente la proteine. Aşa s-ar explica reacţiile încrucişate între polizaharizii proveniţi de la specii bacteriene îndepărtate.

Polizaharizii majorităţii formelor S ale germenilor Gram-pozitivi, sunt solubili şi reacţionează cu antiserurile dar nu sunt toxici şi au slabe proprietăţi antigenice. Cei ai speciilor Gram-negative sunt bogaţi în fosfolipidele existente pe suprafaţa membranei celulare interioare (deci cea către citoplasmă) nu sunt atât de solubili, sunt toxici şi au proprietăţi antigenice. Unele specii bacteriene au în compoziţia lor poliozide, polimeri ai glucidelor cu o specificitate antigenică mai limitată.

## Unele antigene specifice celulelor umane

Organismul uman conţine un număr foarte mare de antigene care-i condiţionează specificitatea de specie, de grup sau de individ. Dintre acestea, mai importante din punct de vedere teoretic şi practic şi, ca atare, mai bine cunoscute sunt antigenele *eritrocitare, leucocitare şi tisulare.*

### Antigenele eritrocitare

Pot fi împărţite în trei mari grupe:

a) antigene heterofile care, în afară de om, se găsesc şi la alte specii de animale;

b) antigene de specie, comune tuturor oamenilor, şi

c) antigene de grup sau aloantigene, specifice unor grupuri de oameni şi absente la alte grupuri.

Dintre antigenele eritrocitare, mai importante sunt cele ale sistemului *ABO, Rh, MN,* Kell-Cellano şi Lewis.

**Antigenele sistemului ABO** au fost menţionate pentru prima dată de către K. Landsteiner în anul 1900. Acesta a constatat că pe suprafaţa eritrocitelor există două antigene diferite pe care le-a denumit aglutinogenele A şi B iar în ser există anticorpi naturali anti- aceste aglutinogene, pe care le-a denumit aglutininele $\alpha$ şi $\beta$. Un individ nu poate avea aglutinogenul A şi aglutinina $\alpha$ sau aglutinogenul B şi aglutinina $\beta$, deoarece aglutinogenele A sau B ar fi aglutinate de aglutininele

respective, situaţie incompatibilă cu viaţa. Ca atare, oamenii care au aglutinogenul A, au în ser aglutininele $\beta$, iar cei care au aglutinogenul B, au aglutininele $\alpha$, relaţia fiind A $\beta$ şi B $\alpha$.

K. Landsteiner a constatat că populaţia umană poate fi împărţită în trei grupe distincte: grupa *0,* lipsită de aglutinogenele *A* şi *B* dar posedând aglutininele $\alpha$ şi $\beta$, cunoscută şi sub denumirea de grupa "donatorilor universali" deoarece pot dona sânge indivizilor aparţinând tuturor celorlalte grupe, dar nu pot primi sânge decât de la cei care aparţin grupei *0*; grupa A cu aglutinogenul *A* şi aglutinina $\beta$ şi grupa *B* cu aglutinogenul *B* şi aglutinina $\alpha$. Ulterior, a fost descoperită şi existeţa celei de-a IV-a grupe, cu indivizi care au aglutinogenele *A* şi *B* dar nu au aglutinine. A fost denumită grupa *AB* sau grupa "receptorilor universali " care pot primi sângele de la indivizii tuturor grupelor, deoarece lipsa aglutininelor proprii permite acest lucru. Deci, oamenii aparţin din punct de vedere al sistemului *ABO* grupelor $0\,\alpha\,\beta$, $A\,\beta$, $B\,\alpha$ şi $A\,B\,0$ sau, după unele notaţii, *0* I, *A* II, *B* III, *AB* IV.

După cum spuneam, grupa *0* I, lipsită de aglutinogenii *A* şi *B*, are numai aglutininele $\alpha$ şi $\beta$, fiind donator universal, iar grupa *AB* IV, lipsită de izoaglutininele $\alpha$ şi $\beta$, are ambele aglutinogene, fiind receptori universali. În realitate, hematiile din grupa *0* sunt aglutinate de serul anumitor indivizi din grupele *A* şi *AB*, precum şi de extractele saline ale seminţelor de *Ulex europeus*, sau de unele seruri imune anti-diferite tulpini de *Shigella*. Faptul demonstrează că aceste hematii posedă unele antigene heterofile.

Transfuzia sângelui este posibilă numai în cadrul aceleiaşi grupe, cu excepţia grupei *0* care "poate dona tuturor", şi a grupei *AB,* care poate "primi de la toţi". Transfuzia eronată de sânge de la o grupă la alta incompatibilă poate fi fatală pentru receptor, deoarece aglutininele proprii vor aglutina hematiile transfuzate, aglutinare urmată de obturarea vaselor sangvine şi moarte.

Grupa *AB* IV, deci a receptorilor universali, o dată cu aglutinogenele *A* sau *B* primite de la donatorii de sânge, primeşte şi aglutininele acestor donatori, care-i vor aglutina propriile hematii. Dar această aglutinare este foarte slabă, fără efecte clinice vizibile, deoarece cantitatea de aglutinine transfuzată este foarte mică, încât coagulii formaţi nu pot influenţa semnificativ organismul receptorului.

Aglutinogenele sistemului *ABO* se transmit ereditar, fiind sub controlul genelor *A* şi *B* cu trei alele (*A, B, 0*), şase genotipuri (*AA, A0, BB, B0, 00* şi *AB*). şi patru fenotipuri (*A, B, 0, AB*).

Grupa *0* este întotdeauna hemozigotă (*00*) iar grupa IV heterozigotă (*AB*), astfel că din părinţi *00* se vor naşte copii aparţinând predominant grupei *0*, iar din cei cu grupele *A* II, *B* III, sau *AB* se vor naşte descendenţi aparţinâd tuturor celor patru grupe, prezenţa variantelor heterezigote *A0, B0,* sau *AB,* permiţând şi exprimarea fenotipului *0* (tabelul 6).

Aglutinogenul *A* este alcătuit din punct de vedere antigenic din mai multe subgrupe ($A_1, A_2, A_3, A_4 ... A_x$), dintre care unele îl exprimă mai bine iar altele mai slab, astfel că pot creea unele dificultăţi de interceptare a reacţiilor *in vitro*. De exemplu, subgrupa $A_1$ exprimă mai bine aglutinogenul decât restul subgrupelor.

Antigenele sistemului *ABO* nu suferă modificări, menţinându-se neschimbate pe toată durata vieţii individului. Este posibilă o eventuală scădere a aglutininelor către bătrâneţe, dar fără importanţă practică majoră.

La un număr foarte mic de indivizi, lipsesc atât aglutininele, cât şi aglutinogenele. Ei aparţin grupului "*OH*" sau tipului "Bombay" şi ar fi expresia fenotipică a represiei genelor care controlează sinteza sistemului *ABO*. Descendenţii lor se comportă normal din acest punct de vedere, moştenind probabil caracterul celuilalt părinte. Din punct de vedere chimic, aglutinogenele A şi B sunt glicoproteine cu greutate moleculară mare, (200-1000 kD), care conţin cca. 80% hidraţi de carbon şi 15-20% proteine. Hidraţii de carbon sunt bogaţi în L-fructoză, D-galactoză, D-glucozamină, D-galactozamină etc, participând la conferirea specificităţii lor antigenice.

Tabelul 6

**Variabilitatea de combinare a produselor genelor care determină grupele sanguine ale sistemului ABO**

| Genotipul | *AA* x *AA* | *AA* x *A0* | *A0* x *B0* | *AB* x *00* |
|---|---|---|---|---|
| Combinaţii posibile | *A*→*A* = *AA*<br>*AA*<br>*A*→*A* = *AA*<br>*AA* | *A*→*A* = *AA*<br>*AA*<br>*A*→*0* = *A0*<br>*A0* | *A*→*B* = *AB*<br>*A0*<br>*A*→*0* = *B0*<br>*00* | *A*—*0* = *A0*<br>*B0*<br>*B*—*0* = *B0*<br>*B0* |
| Fenotipul descendenţilor | A = 100% | A = 100% | A = 25%<br>*AB* = 25%<br>*B* = 25%<br>*0* = 25% | A = 50%<br>B = 50% |

Notă: În combinaţiile *A0* sau *B0*, caracterul *0* este întotdeauna recesiv.

În afară de hematii, aceste antigene sunt exprimate şi pe leucocite, trombocite, spermatozoizi, ca şi pe diferite alte ţesuturi, cum ar fi de pildă mucoasa gastrică, dar nu pe piele, placentă, cristalin etc. Se găsesc în lacrimi şi urină, dar nu în lichidul cefalorahidian.

Antigenele sistemului *AB0* nu sunt localizate numai pe suprafaţa celulelor şi ţesuturilor. Se găsesc şi sub formă solubilă, atât cele fixe cât şi cele solubile, fiind identice din punct de vedere antigenic dar deosebindu-se prin solubilitatea lor: cele din umori sunt solubile în apă, iar cele fixe sunt solubile în alcool. În umori, a fost semnalată existenţa unui antigen particular, antigenul *H*, considerându-se că există sistemul *AB0* cu aglutinogenele *AB* şi sistemele *ABH* în care, pe lângă aglutinogenele A şi B, mai există şi aglutinogenul *H*. Aceste diferenţe individuale se pare că ar fi realizate de către două gene alele (*Se* şi *se*) care conferă calitatea de "secretor" (*Se*) şi "nesecretor" (*se*) acestor aglutinine.

Este interesantă distribuirea pe Glob a fenotipurilor *ABO*. Astfel, dintre albi, 44% sunt grupe *A*, 40% grupa *0*, 12% grupa *B* şi numai 4% aparţin grupei *AB*. Grupa *0* este comună la indienii din America de Nord şi de Sud şi mai rar întâlnită la europeni şi asiatici, unde reprezintă cca. 27-37% în comparaţie cu 75-98% cât se înregistrează la indienii din SUA şi Argentina. În Europa şi Australia, precum şi la albii din America proveniţi din europeni, grupa *A* este predominantă (50-60%), pe când la locuitorii Asiei sau la persoanele de origine asiatică, cum este cazul ungurilor şi bulgarilor din Europa, predomină grupa *B* (39%) care este însă, foarte rară la indienii din SUA şi Argentina, la eschimoşi şi la aborigenii din Australia. Grupa *AB*, deşi rară, se găseşte totuşi într-un procent relativ mare (10%) la egipteni şi chinezi şi foarte scăzut la hinduşi.

**Sistemul Rh.** K. LANDSTEINER şi A. S. WIENER semnalau în anul 1940 faptul că serul iepurilor imunizaţi cu eritrocitele maimuţei *Macaccus rhesus* aglutinează eritrocitele a 85% din oameni. Iniţial s-a descoperit existenţa unui antigen comun maimuţelor şi oamenilor numit "antigenul D", dar ulterior s-a descoperit existenţa altor antigene (*C*, *c D*, *E*, *e*), controlate de şase gene organizate în trei perechi de alele şi anume: *Cc*, *Dd*, şi *Ee*. S-a dovedit că antigenele *d* şi *e* sunt foarte rare, fiind lipsite de importanţă practică, deosebindu-se din acest punct de vedere de

antigenele *C, c, D, E* şi *e*. Cu ajutorul antiserurilor au putut fi identificate 12 tipuri de Rh (tabelul 7). Combinaţiile cele mai frecvente în populaţia umană sunt *CDe* (53,20%), *CDE* (15,85%), *CDE* (14,58%) şi *cde* (12,36%).

*Tabelul 7*

**Grupele antigenice Rh şi identificarea lor cu seruri imune anti-Rh**

| Grupa antigenică anti - *Rh* | Modul de reacţie cu serul imun anti- | | | |
|---|---|---|---|---|
| | C | D | E | c |
| *cde* | 0 | 0 | 0 | + |
| *cdE* | 0 | 0 | + | + |
| *cDe* | 0 | + | 0 | + |
| *cDE* | 0 | + | + | + |
| *Cde/c* | + | 0 | 0 | + |
| *CdE/c* | + | 0 | + | + |
| *CDe/c* | + | + | 0 | + |
| *CDE/c* | + | + | + | + |
| *Cde/C* | + | 0 | 0 | 0 |
| *CdE/C* | + | 0 | + | 0 |
| *CDe/C* | + | + | 0 | 0 |
| *CDE/C* | + | + | + | 0 |

Pe un cromozom poate exista câte un membru al fiecărei perechi de alele, într-un locus fiind doar una dintre cele două alele ale unei perechi, locusul respectiv putând fi deci ocupat alternativ de către una sau alta dintre cele două alele specifice. De exemplu, *C* poate înlocui pe *c, E*, pe e, şi *D* pe *d*. Antigenul *d* din grupa alelică *Dd* nu a fost pus încă în evidenţă, fenotipul *D* fiind reprezentat numai prin calitatea *D*, deoarece fenotipul d este recesiv. De altfel, fenotipul *D* presupune existenţa a două genotipuri, unul *DD* hemozigot şi altul *Dd* heterozigot. Imunologic însă ele sunt *D* ($Rh^+$), hematiile şi unora şi altora aglutinând cu serurile anti *D* ($Rh^+$). Acest fenotip este cel mai antigenic, fiind de altfel principalul responsabil de reacţiile hemolitice post transfuzionale, antigenele *C* şi *E* fiind mai slab antigenice şi mai puţin implicate în generarea hemolizei.

În afară de aceste antigene majore, a mai fost descoperită existenţa unor antigene rare, denumite $C^w$, $C^x$, $E^w$, $C^u$, $c^w$, $c^v$, $D^v$, $E^u$, *f*, *v* etc.

Deci, există mai mult de şase fenotipuri ale sistemului Rh rezultate din cele trei perechi alelice obişnuite, posibilităţile de alelism ale genelor care ocupă acest locus fiind mult mai numeroase. De exemplu, posibilitatea de alelism a alelelor obişnuite *C* şi *c* este *CCcc* şi *Cc* care însă se dublează de la trei la şase dacă se ia în consideraţie intervenţia altei alele, să zicem *D*, deoarece se mai adaugă $CC^w$, $C^w$, $c^w$ şi $C^w{}_c$ astfel că alelismul sporeşte cu fiecare nouă genă care poate ocupa locusul respectiv.

Ţinând cont de toate acestea, teoretic ar exista posibilitatea existenţei a mai mult de 290 de combinaţii liniare ale cromozomilor şi a peste 42 000 de genotipuri.

Antigenele sistemului $Rh^+$ sunt transmisibile ereditar şi sunt responsabile de eritroblastoza fetală. Astfel, o mamă $Rh^-$ care poartă un fetus $Rh^+$ având acest caracter moştenit de la tată, va fi imunizată de hematiile fetale, anticorpii anti-*Rh* apăruţi producând aglutinarea eritrocitelor fetale şi moartea produsului de concepţie.

Spre deosebire de aglutininele $\alpha$ $\beta$ ale sistemului *ABO*, în sistemul *Rh* nu există anticorpi naturali, ei apărând după imunizarea mamei de către hematiile fetale, sau după transfuzii cu eritrocitele subiecţilor *D* ($Rh^+$) la cei *D* ($Rh^-$).

**Antigene specifice de grup sangvin, cu importanţă minoră în reacţiile posttransfuzionale.** Pe lângă antigenele sistemului *ABO* şi *Rh*, care sunt puternic imunogene şi au implicaţii majore în transfuzie şi sarcină, există şi alte sisteme antigenice care nu au valoare practică dar care, dat fiind că reprezintă expresii fenotipice ale genotipului individual, pot fi utile în medicina legală sau în cercetările antropologice. Dintre acestea, ar fi sistemele MN, LEWIS, KELL - CELLANO, LUTHERAN etc.

*Sistemul MN.* Încă din anul 1927, K. Landsteiner şi P. Levine semnalează existenţa factorilor *M* şi *N*. Aceştia sunt alelomorfi (ocupă un locus echivalent pe cromozomul pereche omolog) şi sunt lipsiţi de importanţă pentru transfuzii, subiecţii $M^-$ şi $N^-$ putând primi hematiile celor $M^+$ sau $N^+$ fără a se imuniza împotriva lor. Aceste antigene sunt termorezistente, putând fi obţinute antiseruri prin imunizarea iepurilor cu eritrocite umane fierte. Prin absorbţia ulterioară a acestor antiseruri, au fost obţinuţi anticorpi anti-*M* şi anti-*N* cu ajutorul cărora a fost pusă în evidenţă existenţa homozigoţiei şi heterozigoţiei la nivelul acestui sistem, hematiile unor indivizi aglutinând numai cu serurile anti-*M* sau numai cu cele anti-*N*, fiind deci de genotip *MM* sau *NN*, iar al altora, atât cu serurile anti-*M* cât şi cu cele anti-*N*, fiind heterozigoţi *MN*. În sistemul *MN* sunt unele *antigene rare*, ca de pildă $M_2$ sau $N_2$, din care cauză pot exista indivizi $MN_2$, $M_2N$, $M_2N_2$ etc. Acest gen de variante antigenice are importanţă în stabilirea paternităţii, în cercetări genetice referitoare la transmiterea ereditară a unor caractere etc.

În anul 1947 a fost descoperită existenţa unei gene *S* şi a alelei sale *s*, strâns legată de genele *MN* cu care formează grupe ligaturale genice, cu posibilitatea de realizare sporită a unor fenotipuri şi genotipuri, de interes pentru studiile antropologice şi în special pentru cele de medicină legală, deoarece produsele acestor gene sporesc şansele de precizare a paternităţii.

*Sistemul Kell - Cellano* este format din factorii *K* (Kell) şi *k* (Cellano), descendenţi din două gene autosomale, fără dominanţă şi recesivitate una faţă de alta, putând fi exprimate fenotipic prin antigene corespunzătoare, conform situaţiei redate în tabelul 8.

*Tabelul 8*

**Genotipul şi fenotipul sistemului Kell-Cellano şi relaţia lui serologică**

| Genotip | Fenotip | Comportament serologic |
|---|---|---|
| *KK* | $K^+$ | - Pozitiv anti-Kell<br>- Negativ anti-Cellano |
| *Kk* | $K^+k^+$ | - Pozitiv anti-Kell<br>- Pozitiv anti-Cellano |
| *kk* | $k^+$ | - Negativ anti-Kell<br>- Pozitiv anti-Cellano |

Genele care controlează sinteza celor două antigene sunt *antitetice*, adică, atunci când lipseşte un antigen este prezent celălalt, cele două antigene putând coexista şi în sistem heterolog dar într-un procent foarte mic.

De aceea, antigenele *K* au o frecvenţă extrem de redusă, (cca. 1,2%), iar cele *k*, o frecvenţă mare (cca. 99,8%), heterozigoţii *Kk* reprezentând cca. 1% din populaţie.

Mai imunogen este antigenul *K*, o proteină sensibilă la acţiunea enzimelor proteolitice. El poate fi, ca şi antigenul *Rh*, responsabil de complicaţii posttransfuzionale şi de boala hemolitică a nou-născutului (eritroblastoza fetală), dar frecvenţa sa foarte redusă în populaţie face improbabilă implicaţia sa majoră în aceste forme de patologie imună.

*Sistemul Lewis* a fost descoperit în anul 1946, când s-a constatat că serul unei femei din Anglia, cu numele Lewis, putea aglutina hematiile a cca. 25% din populaţia acestei ţări, fără nici o relaţie cu sistemul *AB0*. De aici concluzia că în serul femeii Lewis erau anticorpi naturali care aglutinau hematiile ce purtau pe suprafaţa lor nişte antigene necunoscute până atunci şi care existau la un sfert din populaţie. Pe această bază, oamenii au fost împărţiţi în două grupe: Lewis-pozitivi sau *Le* $(a^+)$ şi Lewis-negativi sau *Le* $(a^-)$. Factorul *Le* $(a^+)$ se transmite recesiv, din părinţi *Le* $(a^-)$ putându-se naşte copii *Le* $(a^+)$, a cărei frecvenţă este mai mare în primele luni după naştere, pentru ca să scadă apoi în primii ani de viaţă. În afară de eritrocite, aglutinogenele *Le* $(a^+)$ sunt prezente şi în salivă, dar această prezenţă nu este în relaţie cu fenotipul existent la nivelul eritrocitelor, deoarece cca. 90% din indivizi au antigenul *Le* în salivă dar nu şi la nivelul eritrocitelor, adică sunt *Le* $(a^+)$ pentru salivă şi *Le* $(a^-)$ pentru hematii.

Există o mare interdependenţă între sistemul Lewis şi antigenele *ABH*, indivizii *Le* $(a^+)$ având fenotipul "Bombay" şi fiind "nesecretori" de aglutinogene *ABH*, iar cei *Le* $(a^-)$ fiind "secretori" *ABH*.

Acest sistem este încă puţin cunoscut atât din punct de vedere al compoziţiei chimice a antigenelor, cât şi din cel al genelor care controlează sinteza acestor antigene.

*Antigenele Lutheran* sunt controlate de gene localizate pe acelaşi cromozom cu alte gene care sunt responsabile de caracterul fenotipic "secretor" (*Ss*) şi "nesecretor" (*ss*) al antigenelor *AB0* şi *ABH*.

Există două alele, $Lu^a$ şi $Lu^b$, prima fiind dominantă şi responsabilă de exprimarea antigenului *Lu* $(a^+)$, iar cea de-a doua, recesivă. Antigenul *Lu* este exprimat atât în hemozigoţie $Lu^aLu^a$, cât şi în heterozigoţie $(Lu^aLu^b)$, în ambele situaţii indivizii fiind *Lu* $(a^+)$, în timp ce în homozigoţia $Lu^aLu^b$ sunt *Lu* $(a^-)$.

În afară de aceste sisteme antigenice, la om sunt cunoscute multe altele, importante mai mult pentru genetică şi mai puţin pentru imunologie. Este cazul sistemelor *Kidd, Duffy, Vel, Ven, Hunter, Levy, Jobbins* etc., existente la indivizi aparţinând unor rase umane diferite sau la cei care prezintă anumite stări patologice. Ca şi în cazul celor descrise anterior, antigenele acestor sisteme au fost descoperite prin complexe studii serologice, efectuate atât pe indivizi separaţi, cât şi pe grupe de indivizi.

**Antigenele leucocitare şi tisulare**

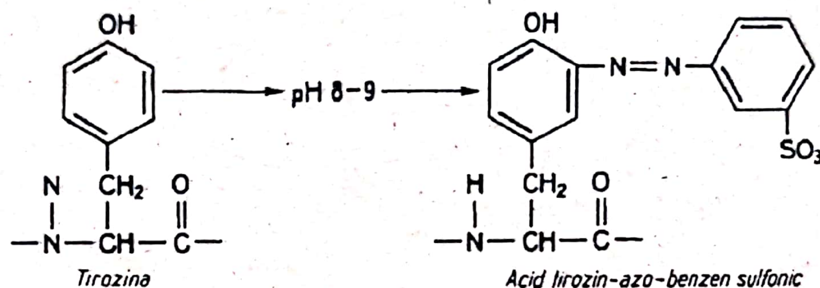
În afară de antigenele exprimate pe suprafaţa hematiilor, există antigene exprimate pe limfocite, macrofage, trombocite, granulocite, sau pe suprafaţa diferitelor celule ale organelor şi ţesuturilor. Ele sunt responsabile de specificitatea de specie, de organ, de grup, sau sunt caracterisitice fiecărui individ din cadrul unei specii date (vezi capitolele "Complexul Major de Histocompatibilitate" şi "Markerii antigenici"). Datorită unora dintre acestea, se realizează rejecţia de grefe alogene, incompatibilitatea între diferite organisme, recunoaşterea antigenelor străine de organism, cooperările celulare etc.

## ANTIGENE ARTIFICIALE

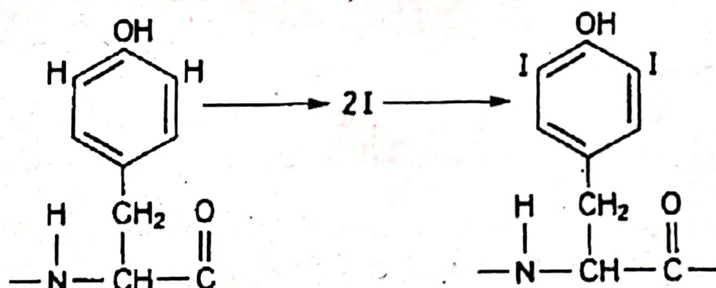
La elucidarea unor probleme legate de compoziţia chimică şi funcţia antigenelor, un aport remarcabil au avut tehnologiile de obţinere a antigenelor artificiale şi sintetice, realizate în primul caz prin cuplarea de proteine la diverse grupări chimice cu greutatea moleculară mică, iar în cel de al doilea caz, prin polimerizarea unui singur aminoacid, sau a mai multor aminoacizi, care permit obţinerea de homo- sau heteropolimeri.

Antigenele artificiale se pot obţine prin legarea proteinelor între ele la diferite grupări chimice cu greutatea moleculară mică. Se realizează conjugarea proteinelor la alte proteine, la haptene, sau la diverse suporturi insolubile prin reacţii de diazotare, iodurare, dinitrofenilare etc.

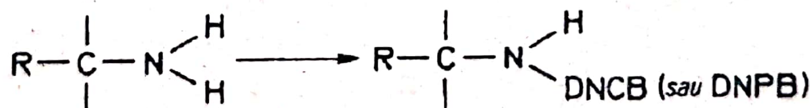
Prin diazotare se obţine "azoproteina". Iniţial se realizează o transformare a haptenei într-o sare diazo- după care este cuplată la un rest de tirozină, histidină, lizină etc., din componenţa unei proteine conform reacţiei:



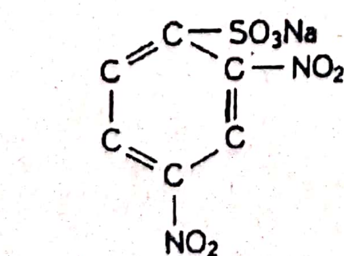

Prin iodurare de realizează substituirea unor $H^+$ din moleculă, cu ioni $I^+$:



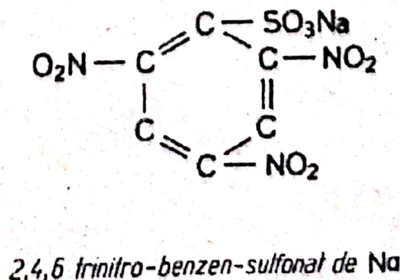

Prin reacţia de dinitrofenilare se realizează substituirea unor atomi de H din gruparea $NH_2$ cu haptene de genul DNPB (dinitrofluorbenzen) sau DNCB (dinitroclorbenzen) după modelul:




De regulă, se folosesc mult haptenele dinitro-benzen-sulfonat de sodiu, sau 2, 4, 6-trinitro-benzen-sulfonatul de sodiu.

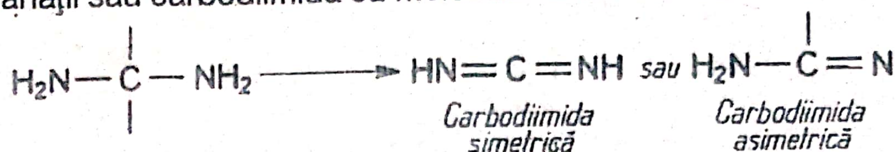



Dinitro-benzen-sulfonat de Na



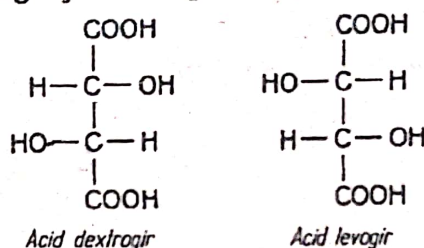

2,4,6 trinitro-benzen-sulfonat de Na

Conjugările proteină + proteină se realizează cu ajutorul unor agenţi de bază ca diizocianaţii sau carbodiimida cu molecula simetrică sau asimetrică.




Prin aceste tratamente proteinele îşi pierd specificitatea de specie, căpătând specificităţi antigenice noi. De exemplu, anticorpii obţinuţi prin imunizarea iepurilor cu albumină bovină iodinată vor reacţiona slab cu albumina bovină normală, dar vor da reacţii de precipitare puternice cu albumina iodurată, indiferent de specia de la care provine.

Cu ajutorul antigenelor artificiale ş-a putut preciza responsabilitatea haptenei în conferirea specificităţii antigenice, în reacţia haptenă-anticorp importantă fiind configuraţia şi nu natura sa chimică. De exemplu, deşi au aceeaşi structură chimică, acidul tartric levogir şi dextrogir au specificităţi antigenice distincte.




S-a mai putut stabili importanţa grupărilor carboxil (- $COO^-$ ), sulfonat ($SO_3^-$ ), arseniat ($AsHO_3^-$ ) etc. în determinarea antigenicităţii haptenelor.

## ANTIGENELE SINTETICE

Au fost obţinute polipeptide sintetice liniare sau ramificate. Cele liniare au ca principali aminoacizi Lys, Glu, Tyr, Ala, înşiruiţi într-un singur lanţ, cu lungimi diferite, format din unul sau mai mulţi aminoacizi. Polimeii ramificaţi sunt asamblaţi în mai multe etape prin adăugarea de lanţuri laterale la o structură liniară centrală care reprezintă un fel de "coloană vertebrală" a moleculei. Pot fi obţinuţi homopolimeri liniari sau ramificaţi, cu diferite greutăţi moleculare, formaţi dintr-un singur aminoacid, sau heteropolimeri liniari sau ramificaţii formaţi din mai multe reziduuri de aminoacizi. De exemplu, în cazul celor ramificaţi "coloana vertebrală" poate fi formată dintr-un homopolimer liniar de lizină la care au fost ataşate lanţurile laterale de Ala având ca reziduuri terminale Tyr, Glu etc. (fig. 10).

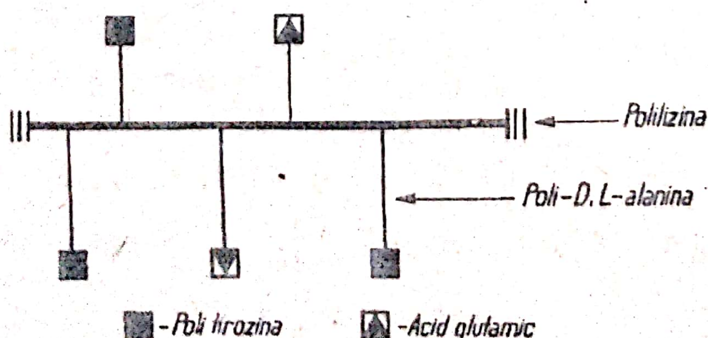



Fig.10. Heterodimer sintetic format dintr-o "coloană vertebrală" de poli-L-lizină la care sunt ataşate lanţuri laterale alcătuite din alţi aminoacizi (Tyr, Al, Glu).

Cu ajutorul antigenelor sintetice s-a putut stabili faptul că un singur aminoacid, chiar dacă este polimerizat în lanţuri lungi liniare sau ramificate, cu greutate moleculară mare, nu este imunogen. Pentru a deveni imunogen, este necesară polimerizarea a minimum trei aminoacizi diferiţi.

Cu ajutorul polimerilor sintetici s-a reuşit descifrarea unor probleme legate de genetica răspunsului imun. De exemplu, prin stimularea cobailor cu DNP-PLL (dinitrofenil-poly-L-lizină) s-a putut preciza că transmiterea caracterului de "reactant" (R) sau "nereactant" (NR) la descendenţi se face conform legilor mendeleene. Gena responsabilă de caracterul R, adică de potenţialul de declanşare a unui răspuns imun după stimulul cu DNP-PLL, este prezentă la tulpina 2 şi absentă la tulpina 13.

De asemenea, tot cu ajutorul acestor polimeri a putut fi precizat rolul greutăţii moleculare a antigenului, cea mai mică moleculă dde DNP-PLL susceptibilă de a induce răspuns imun fiind DNP cu 8 reziduuri de Lys. Se poate concluziona că antigenele sintetice au permis nu numai stabilirea unor legităţi privind condiţiile antigenicităţii dar şi descoperirea existenţei genelor de "răspuns imun" (Ir), adică stabilirea rolului genetic în declanşarea acestui răspuns.

## REACŢII ANTIGENICE ÎNCRUCIŞATE

Există situaţii în care un antigen, de fapt un "mozaic" de antigene (A), are unul sau mai mulţi epitopi dintre care unii se găsesc exprimaţi şi pe alt mozaic de antigene (B).

Inocularea antigenului A va induce sinteza unei populaţii policlonale de molecule de anticorpi care vor reacţiona specific cu epitopii respectivi existenţi atât pe A cât şi pe B (fig. 11). Bineînţeles, anticorpii anti-A vor reacţiona mult mai intens cu A, deoarece vor recunoaşte un număr mai mare de epitopi, iar cei anti-B, desigur, vor reacţiona mai puternic cu B şi mult mai slab cu A. Acest tip de reacţie în care serul imun recunoaşte epitopii existenţi la nivelul a două sau mai multe molecule de antigen se numeşte *reacţie antigenică încrucişată* sau *heterospecificitate.*

Reactivitatea este "parţială", deoarece în populaţia moleculelor de anticorpi numai o mică parte este activă, recunoscând specific un număr limitat de epitopi. Mai mult, paratopul (partea complementară a anticorpului care se fixează pe suprafaţa epitopului) reacţionează la afinitate înaltă cu epitopul care i-a generat formarea şi cu afinitate slabă cu acelaşi epitop aflat în "minoritate" pe altă moleculă de antigen.

Şi în cazul "anticorpilor monoclonali", care "văd" prin definiţie doar un singur epitop, există un oarecare grad de heterospecificitate. O explicaţie ar fi dată de posibilitatea ca într-o proteină de antigen A să existe un fragment peptidic liniar care să reprezinte doar o parte din epitopul discontinuu mai complex de la nivelul proteinei B. În acest caz, proteina liniară ar fi recunoscută mai slab de către anticorpul monoclonal anti-B, deoarece ar avea mai puţine puncte de contact cu paratopul (fig.12). Aşa s-ar explica de ce uneori anticorpii monoclonali pot reacţiona nespecific cu antigene aparent neînrudite între ele.

# COMPETIŢIA ANTIGENICĂ

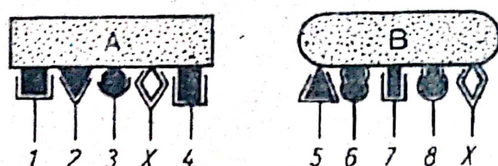



Fig.11. Explicaţia existenţei reacţiilor imune încrucişate între antigene diferite. Grupările purtătoare ale antigenelor A şi B au epitopi diferiţi, cu o singură excepţie, epitopul x care este prezent atât la A cât şi la B. Anticorpii anti-x vor reacţiona numai cu antigenul A (reacţie puternică), dar şi cu B (reacţie slabă).

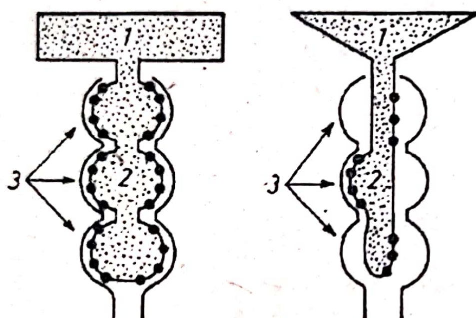



Fig.12. Explicaţie ipotetică a modului de reacţie nespecifică a anticorpilor monoclonali. Un antigen, cu gruparea purtătoare *1* şi epitopii *2*, induce sinteza anticorpilor monoclonali. Alt antigen, cu gruparea purtătoare (*1*) diferită de cea a antigenului inductor, are în secvenţa sa câţiva determinanţi antigenici similari celui folosit pentru obţinerea anticorpilor monoclonali. Aceştia sunt suficienţi pentru a fi recunoscuţi de către situsul combinativ (*3*) al anticorpilor monoclonali specifici primului antigen.

Competiţia antigenică este o "inhibiţie" a răspunsului imun faţă de un stimul antigenic, indusă de către alt stimul, atunci când un antigen este inoculat în anumite raporturi cu un alt antigen.

Competiţia poate fi *intramoleculară, intermoleculară* sau *secvenţială.* În cazul competiţiei intramoleculare, partea cea mai imunogenă a moleculei de antigen inhibă răspunsul imun faţă de partea mai puţin imunogenă. De exemplu, fragmentul *Fc* al moleculei de imunoglobulină este mai imunogen decât fragmentul *Fab*, deprimând răspunsul imun, respectiv sinteza de anticorpi anti-*Fab*. De aceea anticorpii anti-*Fab* se obţin mai greu decât cei anti-*Fc* care apar primii în cursul imunizării şi la un titru mai ridicat.

Competiţia intermoleculară are loc în cazul inoculării unor molecule diferite de antigen, unele dintre ele deprimând răspunsul faţă de altele. De exemplu, globulinele serice sunt mai bune imunogene competiţionând cu albumina serică.

A treia formă de competiţie este cea secvenţială care, de altfel, este şi cea mai importantă din punct de vedere practic, influenţând de multe ori rezultatul vaccinărilor. De obicei, primul antigen inoculat competiţionează cu antigenele inoculate la anumite intervale de timp după el. Cu alte cuvinte, antigenul inoculat înaintea altor antigene le "blochează" celor venite după el posibilitatea de stimulare, de inducere a activării sistemului imun. Pentru realizarea competiţiei antigenice sunt necesare un anumit raport molecular între antigenul care inhibă şi cel inhibat, precum şi un anumit interval de timp în secvenţa inoculărilor. Inhibiţia realizată prin antigenul competiţionat ar putea fi explicată prin prezenţa moleculelor de anticorp cu afinitate mai mare pentru epitopi, prin generarea de către primul antigen a proliferării unor limfocite sau monocite cu funcţii supresoare, care ar inhiba activarea altor clone de celule expuse unui stimul ulterior etc.

Cunoaşterea mecanismelor care duc la competiţie antigenică, în afară de interesul teoretic pe care-l prezintă, are şi o mare importanţă practică deoarece, pe baza acestor noţiuni, se pot folosi scheme de vaccinare fundamentate riguros ştiinţific. Aceasta, mai ales atunci când se practică imunizări multiple în scopul obţinerii unor seruri imune sau când se asociază vaccinuri polivalente în vaccinările preventive.

# VACCINURI

Imunologia a debutat ca o activitate practică, impunând mult mai târziu necesitatea explicării ştiinţifice a fenomenelor observate. Vaccinarea a fost prima utilizare practică a unor legi de bază ale imunologiei, cu mult înainte de a cunoaşte mecanismele care stau la baza instalării protecţiei imune post-vaccinale. Primele vaccinuri folosite au fost cele formate din organisme vii, neatenuate (bacterii, virusuri), înlocuite apoi cu germeni omorâţi sau atenuaţi prin cultivarea lor, fie în alte gazde decât cele naturale, fie în condiţii precare de cultivare *in vitro*, care să le atenueze sau chiar să le elimine total potenţialul patogen, menţinându-l doar pe cel imunogen. În afară de antigenele corpusculare (bacterii, virusuri, ţesuturi etc.), au fost şi sunt folosite vaccinuri obţinute din toxinele bacteriilor transformate în produse atoxice şi imunizante (anatoxine), diverse alte molecule de glicoproteine, glicolipide etc. Toate acestea formează aşa-zisele *vaccinuri convenţionale,* care s-au dovedit în ultimul secol a fi instrumente indispensabile pentru combaterea şi prevenirea unor boli infecţioase, cu răspândire endemică sau epidemică.

Dar vaccinurile convenţionale, pe lângă valoarea lor imunizantă indiscutabilă, uneori pot avea efecte secundare negative. Câteodată pot genera accidente post-vaccinale, ca de pildă declanşarea unor reacţii alergice sau de autoagresiune, pot fi greu de suportat de către organism datorită durerii de la locul de inoculare sau febrei pe care o provoacă sau pot, atunci când germenii sunt incorect atenuaţi, provoca boala naturală cu tot cortegiul ei de efecte dramatice. De asemenea, dat fiind că aceste vaccinuri sunt de fapt adevărate mozaicuri antigenice, competiţionează între ele şi, uneori, pe lângă componentele imunogene, pot conţine şi componente supresoare care să deprime nespecific reacţiile imune. Pentru evitarea acestor neajunsuri, a fost necesară obţinerea de noi vaccinuri, bine definite şi cunoscute, lipsite de efecte secundare nocive. Până în prezent, au fost parcurse diferite etape "istorice", fiecare constituind un pas înainte pe linia îmbunătăţirii vaccinurilor (tabelul 9).

*Tabelul 9*

**Diferite faze de ameliorare a vaccinurilor (după F.Y. LIEW)**

| Faza | Tipul de vaccin | Domeniile în care s-au realizat progrese |
|---|---|---|
| A | Convenţionale | - Imunizarea empirică antiinfecţioasă<br>- Obţinerea de vaccinuri vii, atenuate<br>- Obţinerea de vaccinuri omorâte |
| B | Convenţionale ameliorate | - Realizarea la scară industrială a culturilor de celule<br>- Purificarea antigenelor<br>- Dobândirea de cunoştinţe privind baza genetică a virulenţei<br>- Dobândirea de cunoştinţe teoretice în imunologie |
| C | Proteine sintetice | - Producerea anticorpilor monoclonali<br>- Obţinerea de antigene înalt purificate<br>- Realizarea clonelor de gene şi de secvenţe de gene<br>- Obţinerea de adjuvanţi îmbunătăţiţi |

| Faza | Tipul de vaccin | Domeniile în care s-au realizat progrese |
|---|---|---|
| D | Peptide sintetice | - Imunochimia<br>- Chimia computerizată<br>- Înţelegerea mecanismelor de acţiune a adjuvanţilor |
| E | Peptide sintetice simple | - Chimia medicală<br>- Acţiuni pe diferite sisteme |
| F | Vaccinuri orale | |

În prezent există preocupări susţinute pentru obţinerea de vaccinuri moleculare, de unde şi denumirea lor de *vaccinuri subunitare*. În acest scop, sunt folosite diferite tehnologii dintre care mai uzuale sunt: a) *tehnologia ADN-ului recombinat;* b) *vaccinurile subunitare introduse la purtători heterologi*; c) *realizarea de peptide sintetice şi* d) *utilizarea de anticorpi anti-idiotip* care mimează conformaţia sterică a vaccinului natural.

**Tehnologia ADN-ului recombinat** constă din identificarea, izolarea şi introducerea în plasmide sau alţi purtători adecvaţi, prin "clonare genică", a unui material genetic nou şi menţinerea lui în bacterii, drojdii, celule animale etc, pentru un timp nedefinit. Prin această metodă se urmăreşte obţinerea de vaccinuri antivirale, antibacteriene sau chiar antiparazitare. Primul vaccin comercial obţinut astfel a fost vaccinul ETEC, contra tulpinilor enterotoxigene de *E. Coli* a purceilor, bazat pe următorul principiu: enterotoxina acestor bacterii conţine toxine stabile termic (ST) şi labile termic (LT). Cele ST sunt neimunogene iar cele LT, care sunt imunogene, sunt formate din două subunităţi dintre care una (A), toxigenă şi neimunogenă, iar alta (B), netoxigenă şi imunogenă. Subunitatea B facilitează legarea subunităţii toxice A la epiteliul intestinal. Gena care controlează sinteza subunităţii B a putut fi transferată unei tulpini de *E. Coli*, care sintetizează mari cantităţi de toxină B netoxigenă şi imunogenă cu ajutorul căreia pot fi imunizaţi purceii, conferindu-li-se astfel protecţie faţă de tulpinile enterotoxigene de *E. Coli*.

**Introducerea unor componente ale vaccinului subunitar** în bacterii se bazează practic pe acelaşi principiu descris anterior, cu singura deosebire că materialul genetic este introdus în bacterii care aparţin altor specii decât cea de la care provine acesta. Au fost transferate gene de la bacterii la virusuri (care însă nu s-au dovedit a fi gazde corespunzătoare din cauza capacităţii lor restrictive pentru ADN-ul străin), de la tulpini de *Shigella sonnei* patogene la mutante apatogene de *Salmonella typhi* etc.

Prin sinteză chimică sau biosinteză, au fost obţinute 15 vaccinuri subunitare dintre care unele urmează a intra în uz până în anul 2000 (tabelul 10).

*Tabelul 10*

**Vaccinuri subunitare care urmează a intra în uz până în anul 2000 (după F.M. Audibert şi L.D. Lise)**

| | |
|---|---|
| *Escharichia coli* | Virusul parainfluenzae |
| *Haemophilus influenzae* | Diferite specii de Plasmodium |
| Virusul hepatitei B | Virusul sinciţial respirator |
| Virusul hepatitei de tip 1 şi 2 | Streptococul A şi B |
| Virusul influemzae A şi B | *Streptococcus pneumoniae* |
| *Neisseria meningitidis* | *Vibrio cholerae* |

**Peptidele sintetice utilizate pentru vaccinare.** De regulă, la 5kD de proteină, în care se găsesc cca. 40 de reziduuri de aminoacizi, există un singur epitop, restul materialului, adică 30-35 de reziduuri, nefiind esenţial pentru stimularea funcţiilor imune. Peptidele sintetice, nu sunt altceva decât realizarea *in vitro* a secvenţei active de aminoacizi, adică de formare a epitopilor. Pentru aceasta, sunt identificate genele de la nivelul segmentului de ADN care codifică epitopul după care se asociază *in vitro* reziduurile aminoacide care intră în componenţa acestuia, obţinându-se astfel peptide sintetice debarasate de tot balastul existent în vaccinul convenţional. Până în prezent, a fost stabilită secvenţa completă a unor epitopi de la nivelul ADN-ului complementar al unor virusuri patogene şi se încearcă obţinerea de vaccinuri sintetice pentru a fi utilizate în practică ca agenţi imunizanţi.

Vaccinarea cu produse sintetice este foarte atrăgătoare, deoarece aceste produse nu conţin material infectant iar epitopii pot fi selecţionaţi după dorinţa producătorului, conform scopului urmărit. Dar, peptidele sintetice au doar 10-15 reziduuri de aminoacizi. Pentru a deveni imunizante, ele trebuie să fie cuplate cu "molecule purtătoare" şi cu adjuvanţi. Diferite proteine, eritrocite, particule inerte, lipozomi sau acizi poliaminosintetici sunt utilizate frecvent ca molecule purtătoare, iar ca adjuvanţi $Al(OH)_3$, MDP (muramil dipeptidul sau N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-izoglutamic), adjuvantul Freund complet etc., cu "calităţile" şi "defectele" lor. De exemplu, $Al(OH)_3$ stimulează doar sinteza anticorpilor circulanţi, dar nu şi imunitatea mediată celular, adjuvantul Freund complet poate fi utilizat doar la animale, dar nu şi la om, deoarece provoacă necroze la locul de inoculare etc.

Rezultate încurajatoare au fost obţinute prin folosirea unor peptide sintetice care reproduc fidel secvenţa aminoacizilor proteinei M din *Streptococcus pyogenes* sau pe cea a toxinei bacteriei. De exemplu, bucla $NH_2$ terminală a toxinei difterice "confecţionată" *in vitro* şi cuplată la MDP stimulează sinteza de anticorpi şi asigură protecţia antitoxică. Toxina bacilului *Vibrio cholerae* are, ca şi în cazul *E. Coli*, două subunităţi: subunitatea A, care activează adenilatciclaza, şi subunitatea B, responsabilă de aderarea la receptorii celulei. Au fost sintetizate 9 peptide corespunzătoare subunităţii B care, cuplate la toxoidul tetanic cu rol de moleculă purtătoare, au asigurat o protecţie satisfăcătoare organismelor imunizate. O situaţie similară a fost înregistrată şi în cazul neurotoxinei de *Shigella dysenteriae*. De regulă sunt protectoare peptidele sintetice omoloage cu cele naturale atât la extremităţile $NH_2$, cât şi la cele COOH terminale la care cudarea lanţului primar este identică. De exemplu, în cazul subunităţii B a neurotoxinei *Shigella*, la ambele extremităţi există câte un reziduu de Cys în poziţiile 4, respectiv 57, legate prin legături disulfidice (-S-S-), legare care realizează un epitop discontinuu dominant, expus la suprafaţa moleculei.

Vaccinurile antivirale sintetice constau din peptide liniare scurte, "confecţionate" in vitro, capabile să inducă sinteza anticorpilor neutralizanţi. De pildă, epitopii virusului febrei aftoase pot fi realizaţi prin peptide liniare sintetice, identice cu secvenţele aminoacizilor între poziţiile 141-160 şi 200-213. Un model bun pentru confecţionarea de vaccinuri este virusul influenţei deoarece este foarte bine cunoscută secvenţa aminoacidă din proteinele sale majore (hemaglutinina şi nucleoproteina).

De dată mai recentă, folosirea vaccinurilor sintetice prezintă un mare interes şi poate şi o speranţă în protecţia anti-HIV, unde vaccinurile convenţionale, vii sau atenuate, sunt total inoperante. Se încearcă obţinerea de peptide hibride sintetice care să conţină numai epitopii HIV strict necesari antrenării mecanismelor de apărare imună. Şi în unele parazitoze există tentative de aplicare a vaccinurilor

sintetice. În malarie de exemplu, la sporozoizi există o secvenţă tetrapeptidică (Asn-Ala-Asn-Pro) care se repetă de cca. 40 de ori şi care, ataşată la toxoidul tetanic, poate imuniza activ animalele de laborator.

**Anticorpii anti-idiotip folosiţi ca vaccinuri.** Pe baza "teoriei reţelei" a lui N. JERNE, se încearcă folosirea – ca antigene stimulante în vaccinări – a anticorpilor anti-idiotip de generaţia a 2-a ($A_2$), care mimează perfect conformaţia sterică a epitopului. Este în studiu posibilitatea de folosire a anticorpilor $A_2$ în locul antigenelor naturale în combaterea şi prevenirea hepatitei epidemice cu virusul B, în poliomielită, rabie, *Tripanosoma cruzi* etc. Practic, se preconizează identificarea secvenţei genelor din ADN care controlează sinteza paratopului $A_2$ şi, apoi, obţinerea acestuia pe cale sintetică.

Avantajele folosirii vaccinurilor anti-idiotip ar fi mari deoarece ele sunt strict monospecifice, nu pot provoca boala naturală, nu implică manipulare de material infecţios şi nu pot avea efecte secundare negative asupra organismului. Rămâne de văzut însă dacă aplicarea lor în practică nu va fi cumva limitată ca potenţial imunizant datorită extremei specificităţi a situsului combinativ. În prezent, costul ridicat al acestor vaccinuri, tehnologiile complicate de obţinere a lor, insuficienta cunoaştere a structurii epitopilor multor antigene reprezintă dificultăţi care trebuie depăşite, dar care vor fi depăşite probabil în scurt timp.

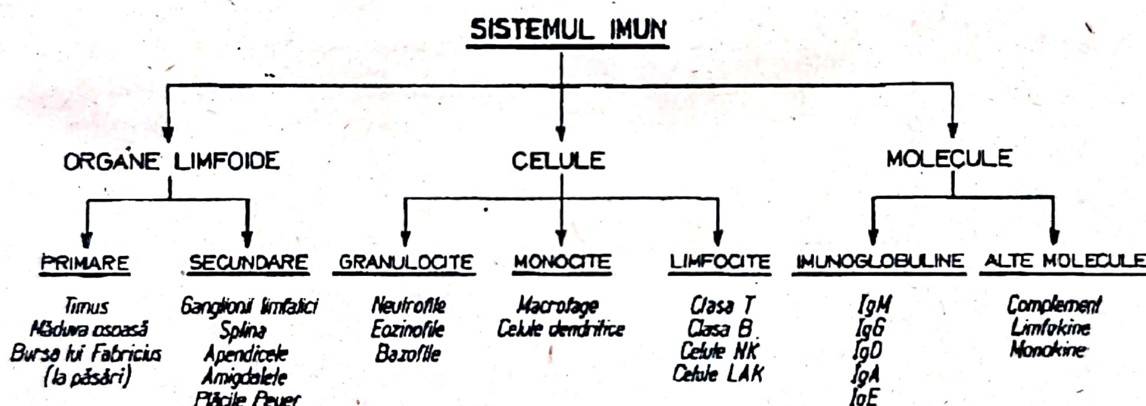
Oricum, este sigur că omenirea se îndepărtează din ce în ce mai mult de "epoca pasteuriană" a vaccinărilor, care va rămâne în istoria medicinei ca un moment major de referinţă, orientându-se spre "epocile viitorului", în care să sperăm că "sinteticul" în toate domeniile de activitate, şi nu numai în cel menţionat aici, nu-l va îndepărta pe om de la "natural", transformându-l dintr-o fiinţă spirituală în una prin excelenţă pragmatică, cu proprietăţi de "maşină" care fabrică la rece necesarul său, uneori în detrimentul mediului înconjurător.

# MIJLOACELE SPECIFICE ALE APĂRĂRII IMUNE

Răspunsul imun este expresia conflictului dintre agresor pe de o parte (bacterii, paraziţi, virusuri, toxine etc.) şi organismul agresat pe de altă parte. Agresorul, prin antigenele sale (analizate în capitolul precedent), deranjează funcţiile normale ale gazdei şi generează din partea acesteia reacţii de apărare care vizează neutralizarea acţiunii lui. Aceste reacţii păstrează amintirea contactului cu agresorul şi contribuie la menţinerea homeostaziei organismului, adică păstrează în limite normale funcţiile sale. Menţinerea homeostaziei este realizată de către un sistem specializat în acest sens, denumit *sistemul imun*, alcătuit din organe, celule şi molecule (tabelul 11).

*Tabelul 11*

**Principalele componente ale sistemului imun**




Componentele sistemului imun se găsesc dispersate în tot organismul şi reprezintă cca. 1% din greutatea acestuia, adică cca. 0,7-1 kg greutate proprie.

## ORGANELE LIMFOIDE

Din punct de vedere structural, organele limfoide sunt formate dintr-o textură de bază alcătuită din celule reticulare care se unesc între ele formând o reţea în ochiurile căreia se găsesc celulele sistemului imun (macrofage, limfocite, celule dendritice etc.). Aceste structuri sunt delimitate la exterior de către o capsulă conjunctivă din care pornesc spre interior travee care delimitează compartimente în interiorul organului.

După modul de apariţie în embrio-geneză şi după atributele lor funcţionale, organele limfoide se împart în două grupe: a) primare şi b) secundare. Şi unele şi altele au caracteristici particulare care le deosebesc fundamental (fig. 13; v. mai departe tabelul 12). Esenţa acestor deosebiri este în primul rând de ordin funcţional: organele limfoide primare "educă" precursorii celulari în vederea îndeplinirii ulterioare a funcţiilor lor, pe când cele secundare sunt sediul în care celulele maturate îşi desfăşoară cea mai mare parte a atributelor lor. La păsări şi mamifere, organele limfoide primare sunt timusul, măduva osoasă şi bursa lui Fabricius, echivalentul măduvei osoase la păsări. Funcţia limfopoietică a acestora este condiţionată de popularea lor cu celule tinere, imature, adică cu "progenitori" derivaţi din celula matcă de la nivelul ficatului embrionar sau măduvei osoase.

Alterările morfo-funcţionale ale organelor limfoide primare sunt urmate de dereglări calitative şi cantitative ale funcţiilor imune, situaţie care nu se înregistrează, sau este de minoră importanţă, în cazul organelor limfoide secundare.

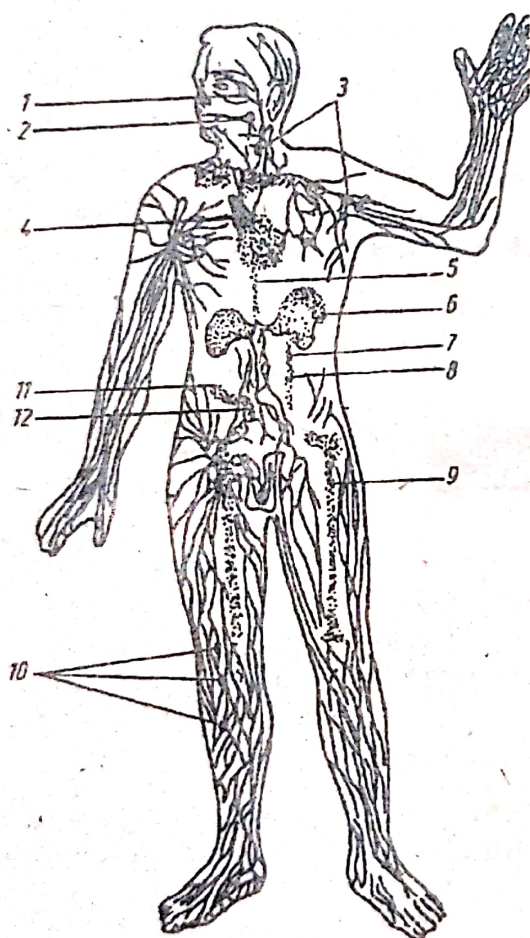



Fig.13. Organizarea sistemului limfoid uman. 1-ganglioni parotidieni; 2-amigdale; 3-ganglioni cervicali şi axilari; 4-timus; 5-canalul toracic; 6-splina; 7-plăci Peyer şi aglomeraţii limfoide de la nivelul intestinului subţire (8); 9-măduvă osoasă (măduva oaselor lungi este hematogenă numai la copii); 10-vase limfatice; 11-apendice; 12-organe limfoide diseminate la nivelul intestinului gros.

## ORGANE LIMFOIDE PRIMARE

### TIMUSUL

Este format din celule epiteliale derivate în timpul embriogenezei din celule de origine ectodermală şi endodermală. Organul se dezvoltă din rudimentele epiteliale ale pungilor brahiale, care vor forma două cordoane care coboară în mediastin până la nivelul inimii. În luna a 2-a de dezvoltare embrionară, în rudimentele epiteliale pătrund trabecule cartilaginoase şi vase sangvine, timusul căpătând o structură lobulară. Acum este colonizat intensiv, cu celule hemopoietice de origine medulară (din celula matcă) care se formează aici (limfocite *T* ), cu macrofage, celule dendritice etc. Toate aceste elemente celulare sunt organizate într-o structură bine definită histologic şi alcătuiesc două zone distincte: corticală şi medulară.

Un strat exterior gros şi unul subţire formează capsula corticală

bogată în sinusuri subcorticale. Trabeculele de fibroblaste şi colagen pătrund în cortex, terminându-se la joncţiunea cu medulara. Acestea conţin fibroblaste, adipocite, eozinofile, neutrofile, mastocite şi macrofage. Macrofagele din timus sunt heterogene din punct de vedere morfologic şi funcţional. Cele din corticală sunt bogate în lizozomi şi sărace în antigene de histocompatibilitate (MHC) de clasa II, iar cele din medulară, lipsite de funcţii fagocitare, ar fi mai bogate în antigene MHC de tip II şi mai sărace în cele de tip I. Celulele dendritice, prezente în special la joncţiunea cortico-medulară, exprimă intens antigenele MHC contribuind, împreună cu celelalte populaţii celulare, la crearea "microclimatului" acestui organ, necesar maturării funcţionale a progenitorilor limfocitari.

Primul epiteliu care se dezvoltă este cel cortical, după care încep să apară mici insule medulare, concomitent cu celulele care exprimă antigenele MHC I şi II. Epiteliul cortical este bogat în filete nervoase şi în neuropeptide, iar cel medular în celule care exprimă intens antigenele MHC. În arhitectura timusului sunt şi arii lipsite de epiteliu, corespunzând locurilor lipsite de antigene MHC.

După naştere, timusul continuă să crească, atingând dimensiunile maxime la vârsta de 10-12 ani, când are greutatea de 30-40 de grame. Dezvoltarea zonei corticale depăşeşte întotdeauna pe cea a medularei (fig. 14). După vârsta de 30 de ani, involuează dar nu dispare complet. Funcţia principală a acestui organ este realizată în etapele timpurii ale vieţii şi imediat post-natal.

La om, timusul are doi lobi şi este situat în mediastinul superior în spatele manubriului sternal. Lobii sunt uniţi între ei printr-un istm. Din capsula fibroasă cu care sunt înveliţi la exterior, pătrund în interior septuri conjunctive care delimitează parenchimul organului (fig. 15), fiecare lob având o zonă

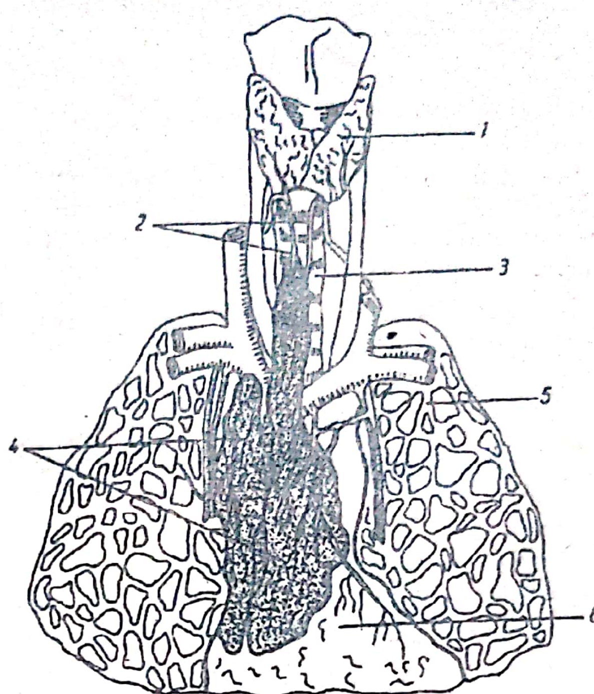


Fig.14. Poziţia timusului în cavitatea toracică. 1-glanda tiroidă; 2-vase sangvine ale timusului; 3-trahee; 4-timusul; 5-pulmonul; 6-pericardul.

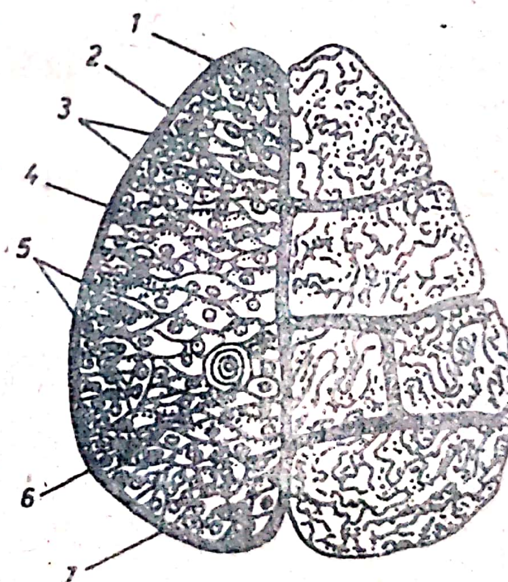


Fig.15. Structura histologică a timusului. Organul are o capsulă fibroasă din care se desprind travee conjunctive care-l împart în compartimente (lobi şi lobuli timici). Parenchimul său este un reticul epitelial în care se găsesc precursori limfocitari aflaţi în diferite stadii de dezvoltare. La exterior este "zona corticală", iar spre interior "zona medulară". 1-capsulă; 2-zona corticală; 3- limfocite; 4-epiteliu reticular; 5-vase sangvine; 6-corpusculi Hassel; 7-medulară.

corticală situată la exterior, şi una medulară situată central. Pentru maturarea limfocitelor educate aici (limfocite timo-dependente sau *T*), descendentele celulei matcă ajung în zona corticală şi de acolo în medulară, continuarea maturării lor fiind critic dependentă de interacţiile cu celulele stromei. Pe măsura maturării lor, celulele se deplasează de la corticală spre medulară, unde-şi câştigă competenţa funcţională după care, prin vasele eferente, părăsesc organul ajungând în circulaţie. Vasele limfatice aferente timusului lipsesc, organul având numai vase sangvine, arteriolele din regiunea corticală formând o reţea de capilare care, trecând prin zona medulară, se unesc deschizându-se spre sinusurile venoase.

Mitoza la nivelul acestui organ este foarte activă, dovadă în acest sens fiind şi conţinutul foarte mare de ADN. Aici ciclul celular se realizează în 4-6 ore, populaţia de timocite fiind înlocuită total în decurs de 4-6 zile, deşi numai cca. 5% dintre acestea reuşesc să ajungă la maturitatea funcţională. Popularea cu precursori limfocitari a zonelor corticală şi medulară a timusului înregistrează diferenţe notabile: raportul dintre numărul limfocitelor şi cel al celulelor epiteliale reticulare este de 100 : 1 în corticală şi de numai 20 : 1 în medulară.

În zona medulară sunt *corpusculii lui Hassal*, formaţi din celule epiteliale care, în centrul acestor formaţii, încep să degenereze fiind înlocuite treptat de către celule venite din exterior. Numărul acestor corpusculi, precum şi dimensiunile lor cresc o dată cu vârsta şi cu impactul organismului cu unele boli infecto-contagioase. Se pare că celulele epiteliale de la nivelul corpusculilor lui Hassal au funcţii fagocitare. În zona medulară a timusului sunt sintetizate glicoproteine, nişte adevăraţi hormoni care stimulează limfopoieza, măresc masa organelor limfoide secundare şi contribuie la maturarea limfocitelor *T* aflate în afara timusului.

În acest organ limfoid primar are loc o proliferare continuă a limfocitelor, în absenţa oricăror stimuli exogeni. De exemplu, la animalele gnotobiotice (cu floră cunoscută şi controlabilă), la care nu există nici un fel de stimul antigenic, organele limfoide secundare, ca de pildă ganglionii limfatici, splina etc. sunt atrofiate, în timp ce timusul nu prezintă nici un fel de modificări. El este un organ autonom, protejat de bariere hematotimice, cu funcţii secretorii endocrine care au un rol principal în maturarea funcţională a precursorilor limfocitari ajunşi la acest nivel şi care vor forma una dintre cele două clase majore de limfocite, şi anume clasa limfocitelor *T*.

Timectomia imediat post-natală a şoarecilor este urmată de instalarea unei alterări fiziologice caracteristice, cunoscută sub denumirea de "boala pipernicirii" ("runt disease"), manifestată clinic prin stagnare în creşterea greutăţii corporale, aglutinarea şi căderea părului, diaree, dermatite, precum şi prin abrogarea funcţiilor dependente de limfocitele *T* (fig. 16). La aceste animale se înregistrează o atrofie treptată a ţesuturilor limfoide, hiperplazia elementelor reticuloendoteliale, scăderea numărului de limfocite din circulaţie (pe seama limfocitelor *T*) şi creşterea compensatorie a procentului de granulocite neutrofile. Ele nu pot rejecta grefele cutanate sau de organe şi nu pot supravieţui în mediul înconjurător mai mult de 1-3 săptămâni de la apariţia primelor semne de "boală de pipernicire", dar pot supravieţui normal în condiţii de sterilitate absolută a mediului şi alimentelor.

Extirparea timusului la animalele mature nu are o influenţă atât de mare asupra reactivităţii imunologice, deoarece organele limfoide secundare au fost deja populate cu limfocite *T* mature.

În afară de timectomia experimentală, realizată în mod deliberat la animale, există şi atimii congenitale apărute spontan. Este cazul atimiei congenitale umane cunoscută sub denumirea de "sindromul Di George", caracterizat prin inexistenţa rejecţiei de grefe de ţesuturi sau organe, prin lipsa de sinteză a anticorpilor consecutiv stimulului cu antigene timo-dependente, prin infecţii cronice bacteriene şi fungice şi prin sfârşit letal. Copiii cu acest sindrom fac de fapt "boala pipernicirii".

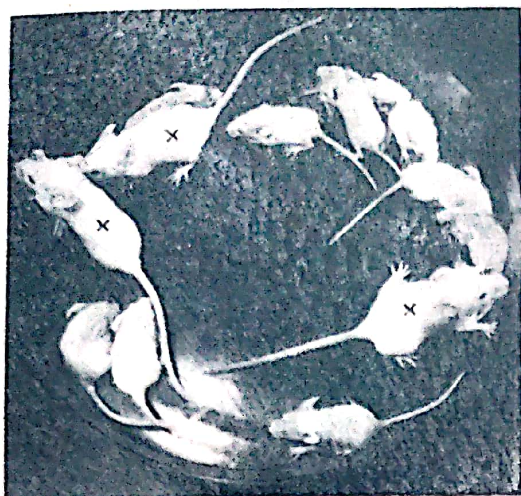


Fig.16 A. Aspectul şi dimensiunile corporale ale şoarecilor timectomizaţi neonatal în comparaţie cu fraţii lor normali (x).



Fig.16 B. Şoarece timectomizat neonatal. Animalul este "pipernicit" (slab, cu părul crescut neomogen, vertebrele caudale vizibile, diaree etc.).

La şoareci, se cunoaşte o tulpină la care, în caz de homozigoţie, există atimia congenitală cu tot cortegiul ei de simptome. Şoarecii, cunoscuţi sub denumirea de *Nu/Nu*, sunt lipsiţi de păr (de aici şi denumirea de "nuzi") şi de posibilitatea de a dezvolta răspuns imun dependent de limfocitele *T*.

Este posibil ca acest sindrom să apară spontan şi la alte mamifere. De exemplu, la iepuri, se înregistrează uneori cazuri similare cu "boala de pipernicire". Ea apare foarte rar la câte 1-2 pui din populaţia unui cuib şi se manifestă prin lipsa părului de pe toată suprafaţa corpului cu excepţia capului, prin stagnarea în creştere şi, în final, prin moarte consecutiv infecţiilor cu germeni banali, apatogeni (fig. 17). Se pare că acest sindrom, de altfel puţin studiat, este, ca şi la şoarecii *Nu/Nu,* sub control genetic. Sunt şi situaţii de inflamaţie a timusului (timite), fie ca urmare a unor infecţii grave, fie datorate unor procese neoplazice. Şi în aceste cazuri, disfuncţia organului este evidentă şi însoţită de simptomatologia descrisă anterior.



Fig.17. Pui de iepure cu atimie congenitală. Se observă dimensiunile corporale şi lipsa părului. Capul, urechile şi labele au aspect normal. Animalul a fost fotografiat alături de un frate al său, normal.

## BURSA LUI FABRICIUS

Este un organ limfoepitelial central, specific păsărilor şi responsabil de maturarea funcţională a celei de-a doua clase de limfocite, limfocitele *B*, care vor secreta anticorpi.

Din punct de vedere anatomic, acest organ este asemănător cu timusul, dezvoltându-se în regiunea cloacei din rudimentele embrionare (fig. 18). Ca şi timusul, bursa are iniţial o structură epitelială pură, pentru ca mai târziu să fie colonizată cu precursorii pre-bursali veniţi aici din sacul vitelin sau din ficatul embrionar. La 13-19 zile de viaţă embrionară, ea devine un organ pur limfoid şi sursă de limfocite *B*. La două luni de la ecloziune involuează, menţinându-şi, ca şi timusul, funcţiile secretorii prin care sunt maturate celulele *B* imature aflate în circulaţie. Puii bursectomizaţi imediat posteclozional nu pot sintetiza anticorpi dacă sunt stimulaţi antigenic cu antigene timo-dependente sau timo-independente, dar dezvoltă în limite normale reacţiile imune mediate celular (rejecţie de grefe etc.). Organele lor limfoide sunt sărace în celule *B*, nu au plasmocite iar în ser nu există practic imunoglobuline, animalele fiind expuse infecţiilor bacteriene şi virale, infecţii care le sunt fatale.

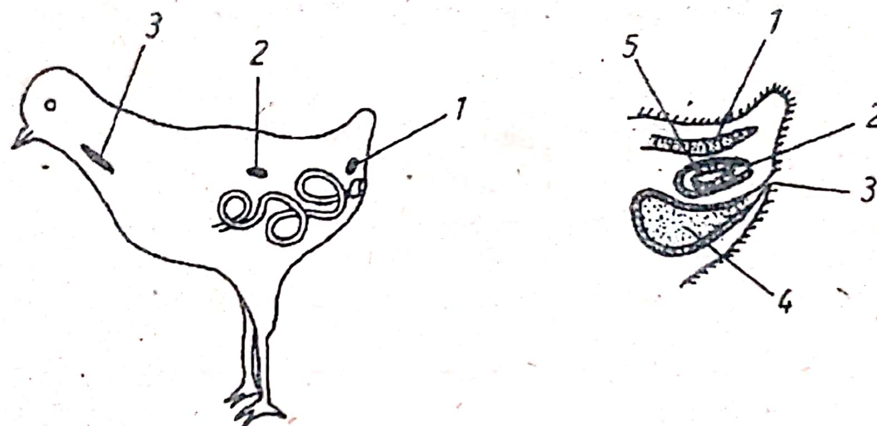



Fig.18. Bursa lui Fabricius la păsări. A. Poziţia în organism a bursei (1), splinei (2) şi timusului (3). B. Organe şi formaţiuni existente în zona anală la păsări. 1-vertebre caudale; 2-ductul bursei; 3-anus; 4-cloaca; 5-bursa lui Fabricius.

## MĂDUVA OSOASĂ

Măduva osoasă, echivalentul bursal la mamifere, are o dublă funcţie: a) de organ limfoid central şi b) de organ limfoid generator de celule matcă.

La copii, aproape toată măduva osoasă este activă hematopoietic, pe când la adulţi hematopoieza are loc numai la nivelul oaselor late ale capului şi trunchiului, măduva oaselor lungi ale membrelor transformându-se în măduvă grasă, nehematogenă. La animalele iradiate s-au putut reconstitui toate elementele sângelui, inclusiv limfocitele, după transfer de măduvă osoasă. În splina lor apar aglomeraţii de celule sangvine în curs de maturare, adevărate colonii de precursori derivaţi dintr-o singură celulă matcă în care se găsesc elementele tuturor liniilor celulare ale sângelui.

La nivelul măduvei hematoformatoare, în afară de celulele matcă, se găsesc şi descendenţii acestora aflaţi în diferite stadii de maturare. În cazul limfocitelor, de pildă, aici se găsesc precursori *B*, limfocite *B* mature funcţional şi chiar şi plasmocite capabile să secrete anticorpi, dar nu se găsesc limfocite *T* mature, ci numai precursorii timpurii ai populaţiei celulare care urmează să migreze către timus în vederea maturării lor. Proporţional, în măduvă, majoritatea celulelor aparţine seriei granulocitare (cca. 60%), urmată în ordine descrescândă de seria eritrocitară (cca. 20-30 %) şi megakariocitar-limfocitară (cca. 20%). Proporţia

limfocitelor în toată această populaţie este mai mare la copii decât la adulţi; 20-30% la prima categorie de vârstă şi 5-15% la cea de-a doua.

Limfocitele pot exista atât ca elemente izolate, dispersate printre elementele aparţinând altor categorii de populaţii celulare, cât şi ca mici aglomeraţii, sub forma foliculară. La nivelul acestui organ, prezenţa plasmocitelor secretoare de anticorpi este accidentală, ele fiind în număr mic, de regulă sub 1%, deoarece măduva, ca şi timusul, nu este locul în care limfocitele au potenţialul şi posibilitatea să primească şi să reacţioneze la stimuli organici.

Circulaţia în măduva osoasă se face pe cale sangvină, sângele ajungând aici prin arteriolele care traversează periostul şi osul compact sub forma unor mici canale. Părăsirea organului de către celulele devenite imunocompetente se face prin sinusurile venoase care colectează elementele mature pentru a fi distribuite apoi în organele limfoide secundare de la nivelul întregului organism. Precursorii care urmează a se matura funcţional în timus, deci care vor deveni limfocite *T*, vor pleca spre acest organ, iar cei care vor fi educaţi în măduvă spre a deveni limfocite *B* vor rămâne pe loc, deşi nu este exclus ca o mică parte să migreze spre ţesutul limfoid asociat intestinului unde să-şi capete competenţa funcţională.

## ORGANELE LIMFOIDE SECUNDARE

Organele limfoide secundare sunt ganglionii limfatici, splina, plăcile Peyer, amigdalele, apendicele, aglomerările limfoide de la nivelul pielii şi mucoaselor, toate populate de către limfocitele "instruite" în organele primare. Alterările morfofuncţionale ale organelor secundare nu afectează grav capacitatea de apărare imună a organismului.

### GANGLIONII LIMFATICI

Ganglionii limfatici sunt structuri mici, nodulare, situate de-a lungul vaselor limfatice şi la principalele intersecţii ale acestora. Prin partea concavă a zonei centrale a unui ganglion limfatic pătrund arteriolele şi fibrele nervoase şi părăsesc organul venulele şi vasele limfatice eferente. Limfaticele aferente pătrund prin partea convexă a organului, traversând capsula oblic (fig. 19). Pereţii lor se contopesc cu capsula iar endoteliul vaselor trece în endoteliul sinusului marginal al ganglionului. De la capsula cartilaginoasă (formată din fibre elastice, celule ale muşchilor netezi şi colagen) care acoperă ganglionul limfatic pleacă radial spre centru trabecule fibroase, care împreună cu fibrele de reticulină alcătuiesc suportul componentelor celulare. Ganglionul are o zonă corticală unde limfocitele sunt aglomerate sub formă de foliculi limfatici cu diametrul de 0,5 - 1 mm şi o

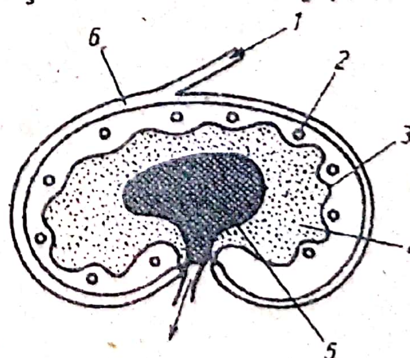



Fig.19. Structura unui ganglion limfatic. 1-limfaticele aferente; 2-folicul limfoid; 3-zona corticală; 4-zona paracorticală; 5- zona medulară; 6-sinus marginal.

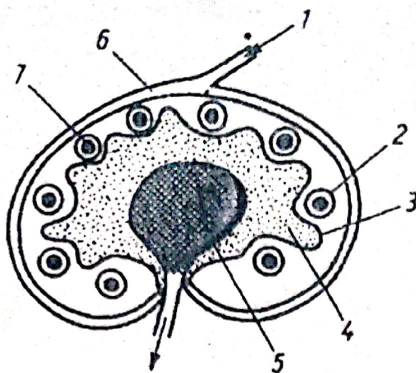


Fig.20. Structura unui ganglion limfatic după o stimulare antigenică puternică a organismului. Se observă hiperplazia foliculilor limfoizi (7).

zonă medulară în care celulele sunt dispuse sub formă de corzi radiale, ambele zone alcătuind "ariile *B*-dependente" ale lui.

La periferia medularei este zona paracorticală, o arie "*T*-dependentă" unde, în afară de limfocitele *T*, se găsesc din abundenţă şi celule antigen-prezentatoare. Foliculii limfatici din zona corticală au un "centru germinativ" sau "centru reactiv" bogat în celule reticulare şi în special în celule limfatice aflate în diferite stadii de proliferare. Dimensiunile centrilor germinativi sunt direct proporţionale cu intensitatea stimulului antigenic. Tot aici are loc şi sinteza anticorpilor (fig. 20). Stimularea cu antigene timo-dependente, care activează limfocitele *T*, este urmată de hipertrofierea zonei paracorticale ca urmare a proliferării acestei clase limfocitare. Dovada o constituie faptul că, în atimii congenitale unde limfocitele *T* lipsesc, hipertrofia acestei zone este absentă. După stimulul antigenic timo-dependent sau timo-independent, proliferează şi foliculii limfatici din corticală, ca urmare a multiplicării populaţiei *B*.

Foliculii sunt despărţiţi unii de alţii prin spaţii interfoliculare în care sunt numeroase macrofage. De la foliculi către zona medulară sunt orientate nişte cordoane de ţesut reticular în spaţiile cărora se găsesc limfocite. Ganglionii au sinusuri, nişte spaţii situate între capsulă, trabeculele fibroase şi masa celulară a zonelor respective, situate marginal sau periferic, cortical, portal etc., prin care circulă limfa şi celulele ce migrează din şi înspre foliculii limfatici şi cordoanele medulare.

Prin intermediul ganglionilor limfatici, al ductului şi al sistemului vascular, limfocitele realizează circulaţia şi recirculaţia lor şi iau parte la efectuarea reacţiilor imunologice. Aproximativ 95% dintre limfocitele ganglionilor limfatici sunt celule circulante care migrează din sânge în ţesutul ganglionar şi invers, prin venulele postcapilare şi limfatice eferente, din ganglion sau circulaţie.

În cazul unor leziuni ale pielii sau mucoaselor, agenţii străini şi în special bacteriile pătrund în organism şi ajung prin canalele limfatice în ganglionii limfatici care reprezintă prima barieră în calea dispersării lor. De regulă, agresorii sunt reţinuţi la acest nivel unde sunt fagocitaţi şi distruşi de către macrofage. Numărul limfocitelor între timp creşte, diferenţa de aspect dintre zonele corticală şi paracorticală devine din ce în ce mai puţin evidentă şi după 3-4 zile îşi fac apariţia primele plasmocite producătoare de anticorpi care devin din ce în ce mai numeroase atât în zona foliculilor, cât şi la nivelul cordoanelor medulare. Sunt şi situaţii în care unele bacterii, cum ar fi mycobacteriile sau brucelele, nu sunt distruse de către celulele fagocitare, înmulţindu-se la nivelul ganglionilor limfatici. Aşadar, ganglionii limfatici sunt organe limfoide secundare care deţin un rol important în realizarea răspunsului imun mediat celular şi umoral şi, implicit, în apărarea organismului faţă de diferite agresiuni bacteriene sau virale.

## SPLINA

Splina este al doilea organ limfoid ca importanţă care însă, spre deosebire de ganglionii limfatici, pe lângă funcţiile imune, are şi alte atribute biologice, ca de pildă colectarea şi distrugerea celulelor moarte, cu referire specială la hematii,

depozitarea rezervelor de $Fe^{2+}$, reglarea circulaţiei etc. La periferie, organul are o capsulă din care pornesc trabecule spre interiorul lui, interior în care se găseşte "pulpa albă" şi "pulpa roşie". Pulpa albă este bogată în ţesut limfoid organizat sub formă de manşoane în jurul unor arteriole centrale, cu limfocitele *T* dispuse periarteriolar formând aria timo-dependentă, şi cele *B* dispuse periferic, formând "foliculii splenici" denumiţi şi "corpusculii Malpighi". Pe lângă limfocite pulpa albă este bogată în macrofage şi celule dendritice având centrii germinativi care sunt de fapt arii periferice *B*-dependente. Se crede că foliculii limfoizi şi centrii germinativi ar fi locul manipulării antigenelor care duc la sinteza anticorpilor de către plasmocite. Principala funcţie a foliculilor ar fi generarea celulelor *B* de memorie. În ariile *T*- şi *B*-dependente sunt "zone marginale" la nivelul cărora se găsesc macrofage specializate care, împreună cu celulele dendritice, prezintă antigenul limfocitelor *T* şi *B*. Tot la acest nivel există numeroşi plasmoblaşti şi plasmocite. Pulpa roşie este formată din corzi mărginite de macrofage, la nivelul ei fiind distruse eritrocitele.

Splina este lipsită de vase limfatice, circulaţia limfocitelor în acest organ făcându-se exclusiv prin circulaţia sangvină care aduce aici, pe lângă celulele sistemului imun, şi antigenele solubile inoculate intravenos sau cele pătrunse accidental în circulaţie, motiv pentru care acest organ este bogat în plasmocite.

Splenectomia la om nu influenţează semnificativ capacitatea de apărare imună, deşi modifică întrucâtva reactivitatea imunologică a organismului, persoanele splenectomizate fiind mai sensibile la acţiunea unor germeni sau paraziţi (vezi Tuftsina).

## AMIGDALELE

Situate în foseta tonsilară între arcurile palatinului, sunt organul principal al inelului limfatic Valdeer. Au aspectul unui ou turtit, partea laterală a suprafeţei lor fiind acoperită cu o capsulă fibroasă prin care pătrund vasele de sânge, iar suprafaţa liberă, orientată către faringe, este acoperită cu un strat epitelial. Capsula are o mulţime de fibre conjunctive care pătrund în parenchim, formând trabecule în care se găsesc numeroase aglomerări de foliculi limfoizi. Principalul element structural al amigdalelor este "criptocitul" (fig. 21), la nivelul criptelor epiteliale din parenchim (fig. 22) realizându-se simbioza limfo-epitelială, element structural caracteristic organelor limfoide primare.

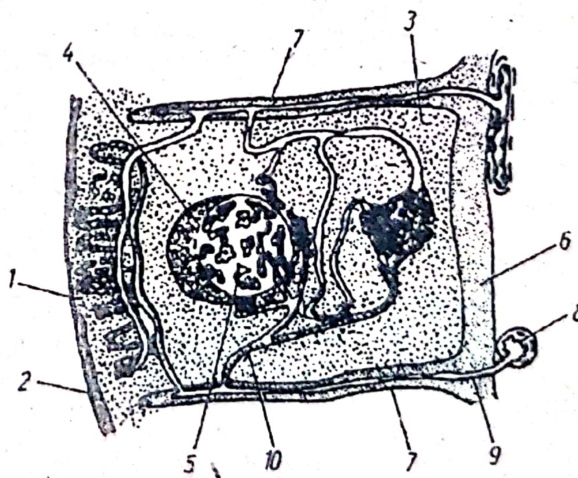



Fig.21. Schema criptolimfonului la amigdale. 1- simbioza limfoepitelială; 2- epiteliul criptic; 3- ţesutul limfoid extramedular; 4- foliculul secundar; 5- centrul foliculului secundar; 6-capsula; 7- trabecule mici; 8- arteriolă; 9-segmentul capsular al arteriolelor; 10- segmentul parenchimal amigdalian al arteriolei.



4 – Imunologie – cd. 114

Amigdalele sunt lipsite de vase limfatice aferente. În ţesutul lor limfoid există foliculi primari şi secundari. Foliculii primari sunt aglomeraţii de celule reticulare şi de limfocite de diferite dimensiuni, iar cei secundari au centrii germinativi şi aglomeraţii celulare situate de-a lungul criptelor, dezvoltarea lor făcându-se după naştere. Acest organ limfoid secundar participă la reglarea componentei florei bacteriene buco-faringiene şi conferă protecţie imună căilor respiratorii superioare. Se pare însă că extirparea lor nu este urmată de efecte negative pentru organism în general, şi nici de alterări importante ale capacităţii de apărare a zonei bucale şi îndeosebi a regiunii laringo-faringiene.

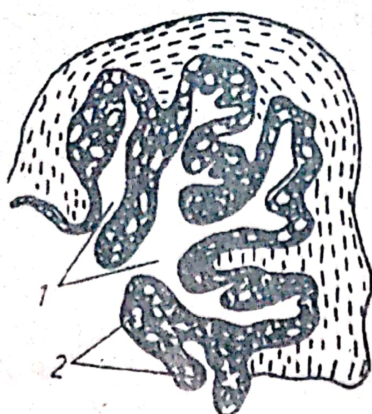


Fig.22. Cripte şi foliculi limfoizi la nivelul amigdalelor. 1-cripte; 2-foliculi limfoizi.

PLĂCILE PEYER

Plăcile Peyer sunt aglomeraţii de celule limfoide de la nivelul "laminei propria" a mucoaselor intestinului subţire, răspândite de-a lungul lui (fig. 23). Se găsesc răspândite în mucoasa jejunului, duodenului şi în special a ileonului, sub formă de foliculi limfatici solitari, cu diametrul de maximum 3 mm, dar foarte numeroşi, la persoanele adulte putând ajunge până la $15 \times 10^3$ de astfel de formaţii solitare. După colonizarea bacteriană a intestinului formaţiunile solitare se pot uni între ele, formând plăci cu lăţimi variabile, care uneori ajung până la 1 cm şi, de asemenea, cu lungimi variabile de câţiva centimetri, numărul lor micşorându-se cu vârsta.

Atât foliculii solitari cât şi plăcile Peyer au centri reactivi unde are loc limfopoieza. Aceşti centri sunt înconjuraţi de un strat compact de limfocite care formează zona corticală a formaţiunii respective. Circulaţia limfocitelor de la aceste formaţii, dinspre ele şi către ele, se face prin vasele limfatice ale vilozităţilor intestinale care sunt în legătură cu circulaţia limfatică generală, inclusiv cu ductul limfatic al toracelui. Limfocitele de la nivelul tubului digestiv, care alcătuiesc aceste formaţiuni, au un rol foarte important în apărarea imună locală, ele sintetizând de predilecţie imunoglobinele aparţinând clasei IgA, cu rol nu numai în apărarea specifică locală, dar şi în reglarea microflorei intestinale.

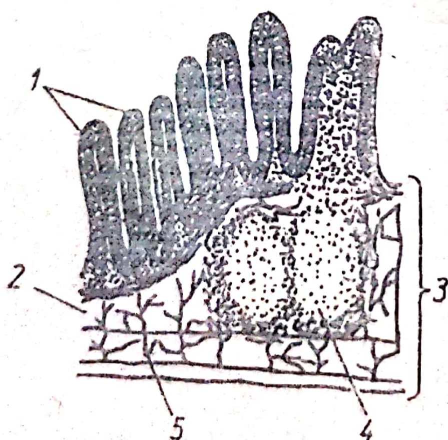


Fig.23. Mucoasa intestinului subţire (aspect pe secţiune a plăcii Peyer). 1-vilozităţi intestinale; 2-epiteliul intestinal; 3-placă Peyer (situată subepitelial); 4- centrul nervos proliferativ; 5-vase limfatice.

## APENDICELE

Apendicele este unul dintre cele mai mari organe limfoide ale tubului digestiv. În componenţa sa se găsesc numeroase aglomerări de celule limfoide, organizate sub formă de "foliculi limfoizi" cu un centru de proliferare celulară în care predomină limfocitele *B* şi plasmocitele secretoare de anticorpi. Ca şi în cazul ganglionilor limfatici sau splinei, foliculii limfoizi ai apendicelui au centrul germinativ mai dezvoltat atunci când organul este expus unor stimuli antigenici puternici.

Multă vreme s-a considerat că la mamifere ar fi posibil ca apendicele să fie organ limfoid primar, echivalentul bursei lui Fabricius de la păsări dar, prin diferite tehnici de investigare, cum ar fi iradierile letale şi reconstituirile sau ablaţia chirurgicală a acestui organ, s-a demonstrat că de fapt el este un organ limfoid secundar care face parte din aglomerările limfoide asociate tubului digestiv.

În afară de organele limfoide amintite, se găsesc răspândite în tot organismul, în punctele cele mai vulnerabile şi expuse agresiunilor venite din exterior, mici aglomerări celulare sau chiar limfocite izolate. Acestea sunt situate aproape de suprafaţa organului respectiv, de regulă sub mucoasele aparatului respirator (trahee, bronhii, bronhiole etc.), în piele, rinichi, creier etc., unde ajung prin circulaţia sangvină şi de unde reintră în circuitul general al organismului. La aceste nivele ele vin în contact cu macrofagele şi cu alte celule prezentatoare de antigen, primind informaţii despre agresor pentru a participa la reacţiile locale sau generale de apărare specifică a organismului.

## SÂNGELE

Sângele este considerat de către unii autori o componentă periferică a sistemului imun, deoarece în el se găsesc practic toate elementele celulare şi moleculare ale acestuia, adică limfocitele *T* şi *B*, monocitele (forma circulatorie a macrofagelor), granulocitele şi chiar şi celule suşă. Deşi sângele conţine cea mai mare parte dintre limfocitele existente în organism, totuşi el nu poate fi considerat un "organ limfoid secundar", ci doar o reţea de căi de comunicaţie care face legătura între diferitele organe limfoide. Într-adevăr, diferitele populaţii celulare aflate în circulaţie, cum ar fi granulocitele, monocitele, limfocitele etc., pătrund sau părăsesc organele limfoide sau ne-limfoide, folosind ca arteră de circulaţie şi calea sangvină.

Dacă unele celule, cum ar fi hematiile sau granulocitele din sânge, reflectă fidel situaţia lor în organism, altele, ca de pildă limfocitele, pot uneori să difere ca număr sau funcţionalitate atunci când sunt în sânge, în comparaţie cu populaţiile din alte organe. Din totalul limfocitelor, doar 5-10% ($2{,}5 \times 10^9$ celule) ajung în torentul sangvin fie ca celule mature virgine, fie precursori celulari imaturi. Numeroşi factori endogeni sau exogeni pot induce mari variaţii în structura acestei populaţii periferice (tabelul 12), aşa că nu întotdeauna celulele de la nivelul venelor sau arterelor, în special cele limfoide, reflectă realitatea existentă la nivelul întregului organism.

*Tabelul 12*

**Diferiţi factori care pot afecta compoziţia subseturilor de limfocite din sânge (după J. Westermann şi R.Pabst)**

| Factori | Populaţii sau subpopulaţii celulare | Sensul numeric al modificării |
|---|---|---|
| *Medicamente, hormoni* | | |
| Cimetidina | Limfocite *T* ($CD4^+/CD8^+$) | Creşte |
| Ciclofosfamida | Limfocite *B* | Scade |
| Ciclosporina A | $CD8^+$ | Creşte |
| Endotoxina | $CD4^+$ | Scade |
| Epinefrina | $CD8^+$ | Creşte |
| Glucocorticoizii | $CD4^+$ | Scade |
| Insulina | Limfocite *B* | Creşte |
| Interleukina - 2 | $CD25^+$ | Creşte |
| *Proceduri medicale* | | |
| Anestezii, operaţii | $CD4^+$ | Scade |
| Splenectomie | Limfocite *B* | Creşte |
| *Diferite stări patologice* | | |
| Candidoze | $CD4^+$ | Scade |
| Scleroza multiplă | $CD4^+$; $CD45^+$ | Scade |
| Pneumonii | $CD4^+$ | Scade |
| Sarcoidoză multiplă | $CD8^+$ | Creşte |
| Pielonefrită | $CD4^+$ | Scade |
| SIDA | $CD4^+$ | Scade |
| Boala Hashimoto | $CD4^+$ | Creşte |
| Purpura trombocitopenică | $CD4^+$ | Scade |
| Lupusul eritematos | $CD4^+$; $CD45^+$ | Scade |
| *Alte condiţii* | | |
| Vârsta înaintată | $CD4^+$; $CD45R^+$ | Scade |
| Sarcină | $CD4^+$ | Scade |
| Nicotina | $CD4^+$ | Creşte |
| Stres acut | $CD8^+$ | Creşte |
| Stres cronic | $CD8^+$ | Scade |

Notă: Referitor la simbolurile $CD4^+$, $CD8^+$ etc., vezi capitolul "Markeri antigenici".

În esenţă, organele limfoide primare şi secundare au atribute funcţionale foarte precise, asemănându-se între ele prin aceea că şi unele şi altele participă la apărarea imună, dar deosebindu-se prin modul cum realizează această participare. Tabelul 13 redă unele dintre aceste deosebiri.

**Caracteristici principale ale organelor limfoide**

| Caracteristica | Organul limfoid | |
|---|---|---|
| | Primar | Secundar |
| Momentul dezvoltării în embriogeneză | Timpuriu | Târziu |
| Provenienţa celulelor care populează organul | Din celule matcă | Din celule instruite în organele primare |
| Popularea cu elemente limfoide precursoare sau mature | Timpuriu, perinatal | După naştere |
| Proliferarea celulelor la nivelul organelor se face | În absenţa stimulului antigenic | Sub influenţa antigenului |
| Activitate hormonală | Prezentă | Absentă |
| Simbioza limfoepitelială | Prezentă | Practic absentă |
| Existenţa ariilor de dependenţă celulară | Absente | Prezente |
| Starea organului în relaţie cu vârsta | Involuează pe măsura înaintării în vârstă | Nu involuează o dată cu vârsta |
| Circulaţia limfocitelor la nivelul organului se face | Într-un singur sens; celulele care părăsesc organul nu mai revin | În dublu sens, celulele putând reveni în organul din care au plecat |
| Efectul extirpării organului asupra răspunsului imun | Reacţiile imune sunt profund alterate | Reacţiile imune sunt nesemnificativ influenţate |

# CELULELE SISTEMULUI IMUN

## COMPONENTELE STRUCTURALE ALE CELULELOR EUKARIOTE

Celula este structura organizatorică la nivelul căreia au loc procese metabolice generatoare ale tuturor formelor de viaţă. Se asigură realizarea reacţiilor biochimice furnizoare de energie necesară exprimării funcţiilor vitale şi conservării caracterelor genetice achiziţionate de-a lungul unui proces evolutiv al cărui început se pierde în negura erelor biologice.

Atât la organismele inferioare, ca de pildă bacteriile şi virusurile, cât şi la cele superior organizate, adică mamiferele, deci atât la celulele prokariote cât şi la cele eukariote, există o organizare fundamentală celulară care constă din prezenţa a trei componente principale, şi anume: a) un nucleu, care la bacterii nu este prea bine conturat, la nivelul căruia se află acizii nucleici depozitari ai zestrei genetice;

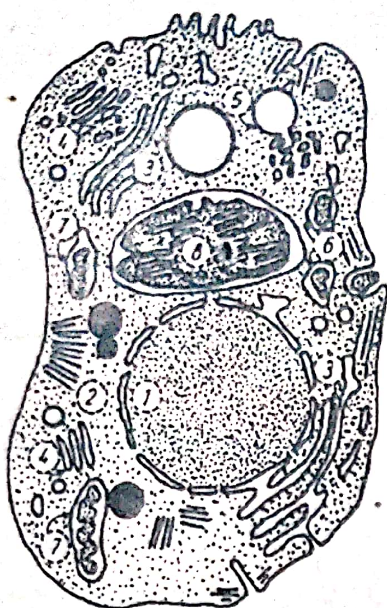


Fig.24. Reprezentarea unei celule eukariote. 1-matricea nucleară; 2-matricea citoplasmatică; 3-reticul endoplasmatic; 4-complex Golgi; 5-vacuole; 6-lizozomi; 7-mitocondrii; 8-cloroplaste (la celule vegetale) (după I.Dinulescu şi col.).

b) o citoplasmă, în care există diferite organite celulare, şi c) o membrană plasmatică ce separă celula de mediul ambiant (fig. 24).

## NUCLEUL

Nucleul este constituentul celulei care "guvernează" toată activitatea acesteia. În general, o celulă are un singur nucleu al cărui volum reprezintă cca. 6% din volumul celular. Sunt însă şi celule cu nuclei mai mari sau mai mici, deci cu diferite rapoarte nucleu/citoplasmă, celule cu doi sau mai mulţi nuclei, cum ar fi neuronii simpatici, osteoclastele, fibrele musculare, unele hepatocite etc., sau chiar celule anucleate, cum este cazul hematiilor la mamifere. De obicei, nucleul este poziţionat central şi are o formă sferică, deşi sunt şi celule cu nucleu elipsoidal sau chiar strangulat, cum este cazul nucleului granulocitelor PMN. La eukariote, nucleul are o membrană periferică alcătuită din două foiţe separate între ele printr-un spaţiu perinuclear. Această membrană delimitează carioplasma în care, în interfază, se poate pune uşor în evidenţă prezenţa cromozomilor, care sunt sediul ADN.

În nucleul tuturor celulelor există unul sau mai mulţi nucleoli bogaţi în ADN, în ARNt şi bineînţeles în ARN-metilază.

## CITOPLASMA

Citoplasma celulelor eukariote are şase organite principale, "dispersate" într-o masă gelatinoasă (tabelul 14), şi anume:

**Citosolul** care conţine scheletul celular, de unde şi denumirea de "citoschelet". Este partea solubilă a citoplasmei, cu o reţea densă de filamente de proteină, reprezentând cca. 54% din volumul celulei. Aici se găsesc restul organitelor celulare şi tot aici au loc multe reacţii chimice prin care celula metabolizează unele molecule care vor servi ca precursori necesari asigurării structurii, funcţiei şi diviziunii ei. Pentru realizarea acestor funcţii biologice, citosolul conţine numeroase enzime, nucleotide, hidraţi de carbon, acizi graşi, aminoacizi etc. De asemenea, conţine proteine care dau forma şi compartimentarea celulei, asigurându-i coerenţa mişcărilor.

Este cazul "microtubulilor", nişte filamente cu dimensiuni între 6 şi 24 nm, al căror conţinut proteic major este "tubulina", capabilă să se organizeze spontan *in vitro* în microtubuli care formează partea principală a citoscheletului. În funcţie de tipul de celulă, în afară de tubulină mai pot exista, mai mult sau mai puţin reprezentate, şi alte proteine, ca de pildă *actina*, care formează filamente mici, adică "microfilamente", *miozina*, care formează filamente mari, *profilina*, care leagă actina C prevenind polimerizarea ei, *tropomiozina* etc.

*Tabelul 14*

**Componentele citoplasmei (după B. Alberts şi D. Bray)**

| Componentele citoplasmei | Procent din volumul total al celulei | Număr aproximativ/ celulă |
|---|---|---|
| Citosol | 54 | 1 |
| Mitocondrii | 22 | 1700 |
| Cisternele reticulului endoplasmic | 9 | 1 |
| Cisternele aparatului Golgi | 6 | - |
| Lizozomi | 1 | 300 |
| Peroxizomi | 1 | 400 |

În cazul limfocitelor, un rol important revine *calmodulinei,* care activează fosforilarea lanţului uşor al miozinei, reglează ATP-aza şi intervine în reglarea sintezei unor kinaze prin intermediul $Ca^{2+}$.

**Mitocondriile** sunt organite celulare capabile să transforme energia de oxidare în energie chimică. Mitocondriile reprezintă cca. 1/4 din volumul total al celulei, fiind separate de citosol prin două foiţe membranare distincte care pot fi traversate specific sau selectiv de către diverse molecule. Mitocondriile generează majoritatea ATP celular.

**Reticulul endoplasmatic,** locul unde celula îşi "fabrică" componentele proteice şi lipidice, este dotat cu o membrană la nivelul căreia, spre latura citosolică, sunt ataşaţi ribozomii.

La acest nivel există diferite enzime implicate în sinteza lipidelor şi proteinelor destinate atât secreţiei cât şi structurării altor organite celulare, inclusiv membranei citoplasmatice. Polipeptidele destinate secreţiei sunt transportate activ prin membrana reticulului endoplasmic către lumenul acestuia după care, aşa cum este cazul imuno-globulinelor, ajung în aparatul Golgi, de unde sunt eliminate extracelular, fie sub formă de molecule libere, fie rămânând ataşate la suprafaţa celulei. Multe proteine nu sunt eliberate în lumenul reticulului endoplasmatic, lanţurile lor polipeptidice fiind reţinute pe suprafaţa citosolică a membranei acestuia, după care sunt glicozilate şi exportate spre lizozomi, peroxizomi, spre membrana nucleului etc.

**Aparatul Golgi** este alcătuit dintr-o sumă de cisterne înconjurate de mici vezicule. Proteinele din lumenul şi membranele reticulului endoplasmatic sunt transferate prin intermediul unor vezicule de transport în lumenul aparatului Golgi, de unde sunt orientate spre formele moleculare finale, mature funcţional. Aici polipeptidele suferă modificări substanţiale, care constau din desfacerea unor oligozaharide legate prin Asp la nivelul reticulului endoplasmic şi eventuala adiţie a altor zaharuri sub controlul unei activităţi enzimatice complexe.

Proteinele sunt exportate din aparatul Golgi spre destinaţii intracelulare sau extracelulare, atât prin intermediul veziculelor care înconjoară cisternele acestui aparat, precum şi graţie receptorilor de la nivelul membranei Golgi care recunosc diferite segmente din lanţul proteinelor ce urmează a fi transportate. Pentru adiţia glucidelor, în aparatul Golgi acţionează secvenţial cel puţin trei glicoziltransferaze care folosesc glucidele activate prin legarea la substraturi nucleotidice.

**Lizozomii** sunt specializaţi pentru digestia intracelulară, motiv pentru care conţin o mare cantitate de enzime hidrolitice active la *p*H acid. Hidrolazele sunt sintetizate în reticulul endoplasmic şi transportate prin aparatul Golgi la lizozomi. Se pare că la hidrolazele lizozomale este ataşat un oligozaharid manozo-fosfat, care poate fi recunoscut de către un receptor situat la nivelul aparatului Golgi şi care facilitează apoi transportul proteinelor glicozilate.

**Peroxizomii** sunt organite specializate pentru efectuarea reacţiilor oxidative prin generarea de $H_2O_2$ şi degradarea acesteia prin catalazele pe care le conţin.

## MEMBRANA PLASMATICĂ

Membrana plasmatică este un filtru activ care delimitează celula de mediul înconjurător, permiţându-i în acelaşi timp menţinerea unui contact strâns cu elementele acestuia. Ea nu este un simplu perete despărţitor, ci un organism viu şi extrem de complex care realizează contactul celulei cu diverşi ioni, molecule sau alte celule.

Prin intermediul unor componente glicoproteice cu funcţie de receptori pentru diverşi liganzi, celula primeşte informaţii din afară şi le transmite în interior sub forma unor cascade de reacţii biochimice care, în fond, sunt adevărate relee biochimice şi biologice. Aceste semnale comandă modificări profunde, ca de pildă modificarea celulei sau activarea unor funcţii secretorii ale ei care, la rândul lor, pot avea rol de mesageri celulari. Atât membrana plasmatică, care delimitează celula la exterior, cât şi celelalte membrane ale organitelor şi formaţiunilor interne ale celulelor eukariote - adică nucleul, mitocondriile, aparatul Golgi, reticulul endoplasmic - au o structură comună, fiind alcătuite din lipide şi proteine legate între ele prin interacţiuni necovalente.

Moleculele de lipide sunt dispuse în două straturi de câte 4-5 nm grosime fiecare, formând un *dublu strat lipidic* care funcţionează ca o barieră pentru moleculele hidrosolubile. Acest dublu strat lipidic fluid este format din cca. $10^9$ molecule, în el plutind proteine hidrofobe rigide care realizează diferite funcţii ale membranei, cum ar fi transportul intra- şi extracelular al enzimelor sau al altor molecule, exprimarea receptorilor, antigenelor de membrană, a moleculelor de adeziune etc. Toate membranele, atât cea plasmatică cât şi cele interne, sunt structuri fluide, dinamice, în care lipidele şi în special proteinele se pot deplasa rapid în plan lateral sau vertical.

Mişcările în plan lateral favorizează legarea încrucişată a receptorilor, asocierea lor, transmiterea semnalelor de la exterior spre interiorul celulei etc. Deplasările în plan vertical sunt mai rare, ele favorizând exprimarea sau mascarea unor determinanţi antigenici specifici celulei (modulaţie antigenică).

Fluiditatea lipidică, sau, cum mai este denumită, microviscozitatea, este neomogenă, cu o distribuire neuniformă a componentelor proteice.

După unii, ar exista trei clase diferite de componente ale membranei, care ar ocupa diferite regiuni în planul ei. Ar exista componente de clasa I, care difuzează liber în planul membranei, alcătuind domeniul de tip I ce reprezintă structura fluidă a mozaicului, componente de clasa II, ancorate la microfilamentele din citoschelet care ocupă domenii semifluide contractile de tip II, şi componente de clasa III, ancorate la microtubulii citoscheletului care ocupă domeniile III rigide. Deci, componentele mobile şi imobile pot coexista la nivelul membranei, fapt care permite deplasarea şi internalizarea unor structuri ale acesteia.

**Lipidele membranei plasmatice.** Prin difracţie în raza X s-a putut preciza că moleculele lipidice sunt dispuse în două straturi distincte: unul la exterior, alcătuind faţa externă a membranei, şi altul la interior, reprezentând faţa internă sau citoplasmică a ei. Fosfolipidele, glicolipidele şi colesterolul care compun stratul lipidic celular sunt molecule *amfipatice*, cu un "cap" hidrofilic şi o "coadă" hidrofobă de 14-24 atomi de C, care reprezintă mai mult de 50% din volumul membranei. În mediu lichid, datorită caracterului amfipatic, formează spontan fie micelii, fie un strat dublu linear sau circular cunoscut sub denumirea de "lipozomi", în care capul hidrofilic este orientat spre exterior iar coada hidrofobă spre interior (fig. 25).

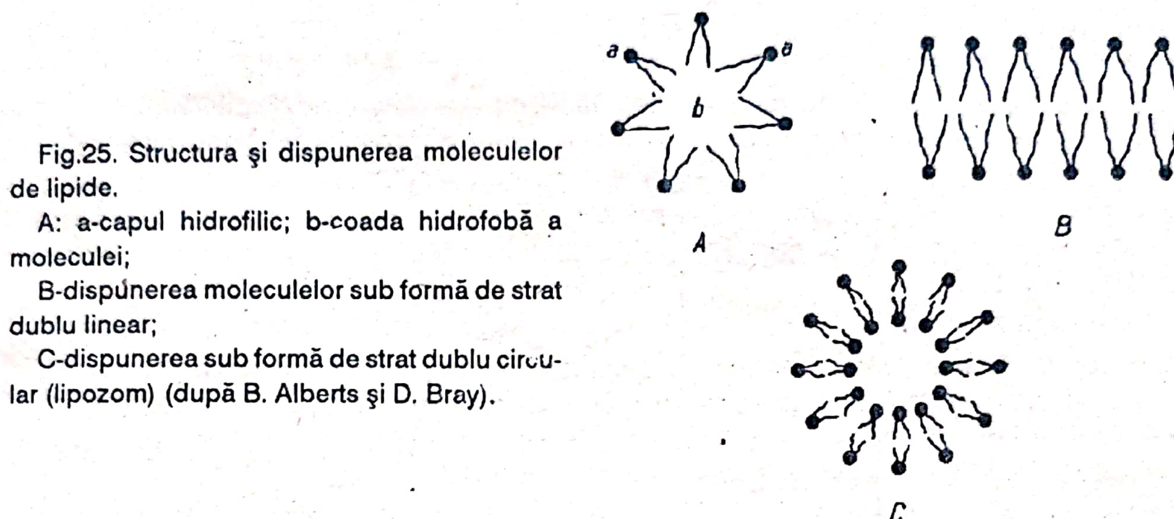



Fig.25. Structura şi dispunerea moleculelor de lipide.
A: a-capul hidrofilic; b-coada hidrofobă a moleculei;
B-dispunerea moleculelor sub formă de strat dublu linear;
C-dispunerea sub formă de strat dublu circular (lipozom) (după B. Alberts şi D. Bray).

Moleculele îşi schimbă rapid locul între ele, se rotesc în jurul axului propriu şi difuzează lateral, proces care asigură fluiditatea membranei.

La realizarea fluidităţii mai participă şi alţi factori ca de pildă lungimea cozii moleculei, conţinutul în colesterol, compoziţia acizilor graşi etc. De exemplu, moleculele cu extremitatea hidrofobă mai scurtă, adică cu un număr mai mic de atomi de C nesaturaţi, cu duble legături *cis*, realizează membrane cu o fluiditate mai mare, situaţie în care un eventual avantaj ar fi conferit şi de existenţa unei proporţii reduse de colesterol.

În membranele plasmatice ale celulelor eukariote ar exista un raport 1:1 între moleculele de fosfolipide şi colesterol, ultimul interacţionând cu extremitatea hidrofilă a fosfolipidelor cu rol de "reglator de viscozitate": previne scăderea fluidităţii membranei atunci când celula se găseşte în mediu cu temperatură scăzută, sau creşterea anormală a ei la temperaturi crescute. Un rol important din acest punct de vedere revine şi acizilor graşi saturaţi şi nesaturaţi, proporţia dintre aceştia contribuind nemijlocit la menţinerea fluidităţii în limite normale. De exemplu, la organismele poikiloterme, a căror temperatură variază o dată cu temperatura mediului, se înregistrează schimbări în conţinutul acizilor graşi din membrană, schimbări care menţin fluiditatea acesteia relativ constantă.

Membrana plasmatică a celulelor prokariote conţine un singur tip de molecule de fosfolipide şi este lipsită de colesterol.

La eukariote există o cantitate mare de colesterol şi mai multe tipuri moleculare de fosfolipide, dintre care mai bine cunoscute sunt fosfatidil-colina, fosfatidil-serina, sfingomielina şi fosfatidil-etanolamina. Fosfolipidele şi colesterolul deţin 95% din totalul lipidelor, restul de 5% revenind glicolipidelor care, la eukariote, derivă dintr-un alcool aminat lung, sfingozina, iar la prokariote, din glicerol. Cea

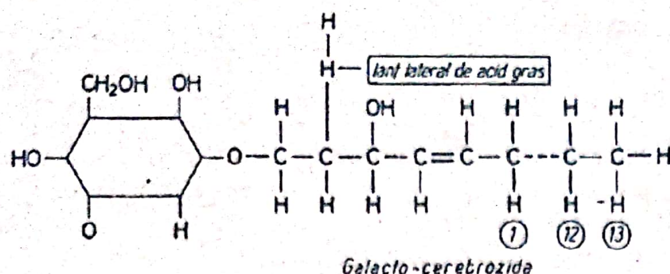



Fig.26. Structura chimică a moleculei de galactocerebrozidă, cu ilustrarea modului de legare a lanţului lateral de acid gras la hidratul de carbon (după B. Alberts şi D. Bray).

mai simplă moleculă glicolipidică este *galactocerebrozida* cu capul polar format din galactoză (fig.26), iar cele mai complexe molecule sunt *gangliozidele* cu capete polare formate din galactoză, galactozamină sau glucoză, asociate cu una sau mai multe molecule de reziduuri de acid sialic (acidul N-acetil neuraminic sau NANA). Acest reziduu le conferă o sarcină electrică negativă (fig. 27).

Suprafaţa exterioară a membranei plasmatice este bogată în sfingolipide derivate din ceramidă. Celulele eukariote au peste 300 de tipuri de sfingolipide care participă la numeroase procese biologice fundamentale, cum ar fi proliferarea şi diferenţierea celulară, transformarea oncogenică, transducţia intracelulară a semnalelor etc.

Sfingomielina, o grupare fosforilcolinică ataşată printr-o legătură fosfodiesterică la ceramidă, este hidrolizată de către o sfingomielinază neutră a cărei sinteză este stimulată de către vitamina $D_3$, lipidele derivate din această hidroliză servind ca modulatori endogeni ai căilor de transmitere a semnalelor în limfocite.

Sfingozina, rezultată din deacilarea ceramidei la atomul de C din poziţia 2, inhibă activitatea proteinkinazei C (PKC), influenţând astfel procesele biochimice intracelulare.

De altfel, rolul lipidelor de pe suprafaţa membranei plasmatice este extrem de complex, alterările la acest nivel putând avea uneori consecinţe foarte importante asupra întregii funcţii a celulei şi, implicit, a organului sau ţesutului în care se găsesc aceste celule.

**Proteinele membranei** alcătuiesc restul de 50% din volumul ei, reprezentând cel de-al doilea component principal al acesteia. Dacă, volumetric, proteinele membranare se găsesc în proporţie aproape egală cu cea a lipidelor, ca număr de molecule, proporţia nu se mai păstrează; dimensiunile unei molecule de proteină fiind mult mai mari, raportul dintre numărul lor şi cel al moleculelor de lipide este de cca. 50 : 1.

Proteinele sunt inserate în dublul strat lipidic pe care-l pot traversa de la o suprafaţă la alta într-o manieră de "tip imunoglobulinic" sau de "tip lectinic" (fig. 28), pot fi implantate la nivelul unui singur strat sau, pur şi simplu, pot fi ataşate covalent la extremităţile polare hidrofile ale lipidelor sau altor molecule de proteine (fig. 29). Ca şi lipidele, moleculele de proteine sunt amfipatice, cu o regiune hidrofobă, care interacţionează cu regiunea hidrofobă a lipidelor din interiorul dublului

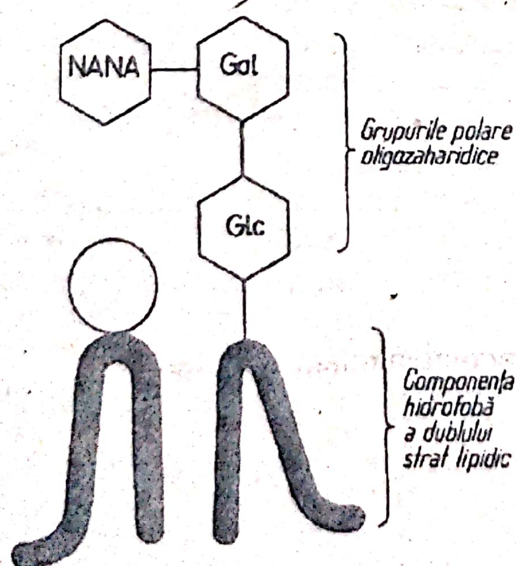



Fig. 27. Structura unei molecule de gangliozid (după B. Alberts şi D. Bray).

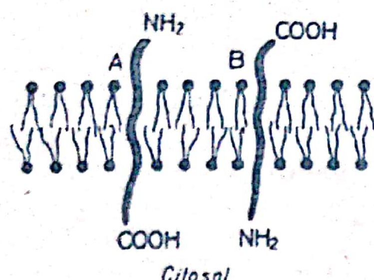



Fig.28. Proteine de "tip imunoglobulinic" (A) şi de tip "lectinic" (B). Proteinele de "tip imunoglobulinic" au extremitatea $NH_2$ terminală situată extracelular, pe când cele de "tip lectinic" au această extremitate implantată în citosol (intracelular).

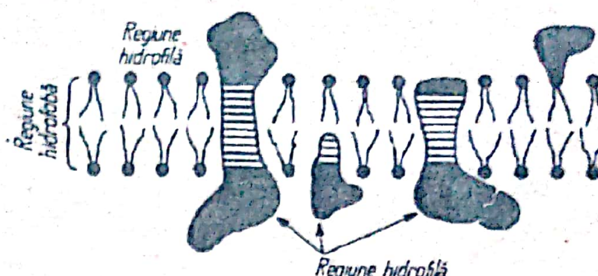



Fig.29. Proteine implantate în dublul strat lipidic al membranei sau numai ataşate acestuia (după B. Alberts şi D. Bray).

strat lipidic, şi alta hidrofilă, expusă la suprafaţa exterioară şi interioară a membranei (v. fig. 29). Aceste două suprafeţe ale membranei diferă între ele prin conţinutul lipidic şi proteic, diferenţă care-i realizează asimetria funcţională. Se pare totuşi că balanţa energetică face ca regiunea transmembranară a proteinei de membrană să conţină predominant regiuni hidrofobe cu o structură secundară precisă, de $\alpha$-helix, şi cu plieri în structuri ternare şi cuaternare compacte. Plierea lanţului, formarea $\alpha$-helixului şi organizarea cuaternară s-ar realiza în două stadii diferite: iniţial s-ar forma $\alpha$-helixuri stabile, care ar traversa straturile lipidice ale membranei, după care acestea ar interacţiona între ele formând proteinele globulare încorporate în stratul lipidic (fig. 30).

O caracteristică importantă a proteinelor membranare, cu profunde implicaţii biologice, este capacitatea lor de a se lega încrucişat, de a se aglomera sub formă de "pete" sau de puncte difuze şi de a se deplasa spre polii celulelor, putând fi eliminate de la suprafaţa acestora fie prin desprindere, fie prin internalizare. Mobilitatea laterală a proteinelor membranare poate fi însă blocată, ele rămânând relativ fixe în plan orizontal. Această blocare se realizează fie prin agregarea lor sub formă de complexe voluminoase, destul de grele pentru a se mai deplasa, fie prin ancorarea lor la alte structuri ale citosolului sau la proteinele din membrana altor celule (fig. 31).

Ca şi lipidele, proteinele membranei plasmatice au mişcări rotaţionale în jurul axului propriu, mişcându-se prin difuzie laterală în dublul strat lipidic cu un coeficient de difuziune care realizează între $10^{-9}$ şi $10^{-12}$ $cm^2$/secundă, faţă de coeficientul de $10^{-8}$/secundă al moleculelor de fosfolipide.

Funcţiile de "markeri antigenici", de receptori, sau de suport pentru multe enzime sunt realizate de către proteinele membranei implantate în dublul strat lipidic al ei. Tot aceste molecule sunt implicate în transportul transmembranar al unor compuşi diferiţi cu greutate moleculară mică.

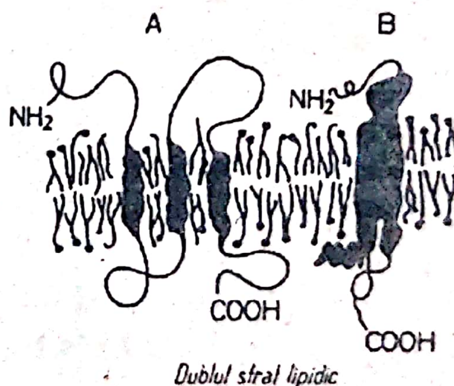



Fig.30. Modul de organizare a proteinei implantată în dublul strat lipidic al membranei plasmatice. Într-o fază iniţială, lanţul polipeptidic traversează de mai multe ori stratul lipidic (A). Într-o fază ulterioară, devine o structură compactă, globulară, ca rezultat al formării pliurilor terţiare şi cuaternare a lanţului primar (B) (după W.Kanpp şi col.).

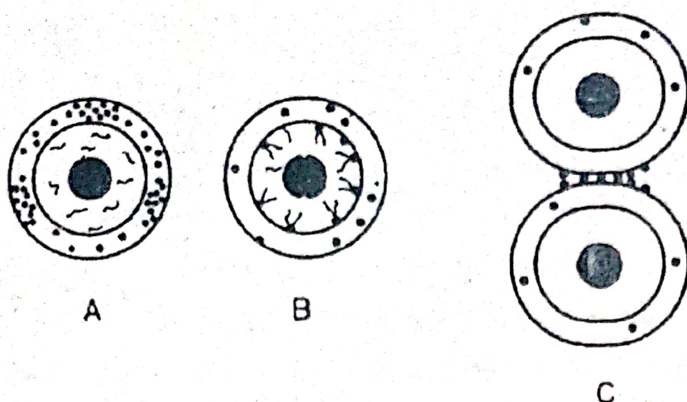



Fig.31. Diferite posibilităţi de imobilizare a proteinelor din structura membranei plasmatice. A-prin agregare sub formă de complexe voluminoase; B-prin ancorare la citoschelet; C-prin fixare la proteinele de pe suprafaţa altor celule.

**Hidraţii de carbon** se găsesc sub formă de glicoproteine sau glicolipide formate din legarea oligozaharidelor la proteinele sau lipidele membranei. Spre deosebire de lipide, care pot lega un singur zaharid, o moleculă de proteină poate lega mai multe reziduuri de hidraţi de carbon (fig. 32). Aceştia sunt expuşi numai la suprafaţa exterioară a membranei, formând *glicocalixul* sau *glicolema,* negăsindu-se niciodată pe suprafaţa ei citosolică. Reprezintă cca. 2-10% din greutatea membranei plasmatice şi au rol în legarea şi recunoaşterea diverşilor liganzi. În componenţa glicocalixului există cca. 10% din totalul tipurilor de molecule de glucide existente în natură, dintre care cele mai importante sunt manoza, glucoza, fucoza, galactozamina şi acidul sialic, acesta din urmă realizând o sarcină electrică negativă.

Este posibil ca aceste oligozaharide, pe lângă rolul lor în relaţia receptor-ligand pentru unele lectine, să mai participe activ şi la fixarea proteinelor la matriţa lipidică membranară sau, prin intermediul integrinelor în componenţa cărora ar putea exista, la unele procese de aderare celulară.

Deşi membrana plasmatică este practic impenetrabilă, totuşi, funcţia ei de barieră este relativă, putând fi traversată de o serie întreagă de ioni, aminoacizi, nucleotide, hidraţi de carbon etc. Acest pasaj transmembranar este determinat de către caracteristicile elementelor care traversează membrana, dar şi de către proprietăţile membranei traversate. Astfel, moleculele mici, liposolubile, polare sau cu o încărcătură slabă de sarcină electrică, traversează uşor membrana în timp ce moleculele mari, polare, sau cele mici dar cu o încărcătură de sarcină

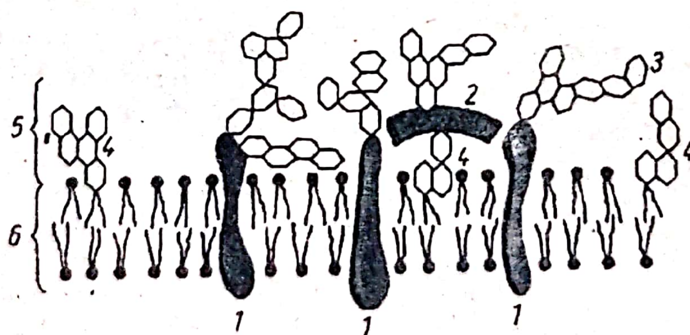



Fig.32. Modul de legare a hidraţilor de carbon la membrana plasmatică a celulei. Hidraţii de carbon, reprezentaţi sub formă hexagonală, se leagă atât la proteinele cât şi la lipidele membranei, formând glicocalixul. La o moleculă de proteine se pot lega mai multe molecule de hidraţi de carbon, pe când la o moleculă lipidică se leagă doar o singură moleculă de hidraţi. Hidraţii de carbon sunt întotdeauna ataşaţi numai la suprafaţa exterioară a membranei plasmatice.

1-proteine transmembranare; 2-proteine "ataşate"; 3-glicoproteine rezultate din combinaţia proteină+hidraţi de carbon; 4-glicolipide (lipide+hidraţi de carbon);5-glicolema sau glicocalixul; 6-dublul strat lipidic al membranei (după B. Alberts şi D. Bray).

electrică mare o traversează greu sau deloc (fig. 33). În traversare sunt implicate unele *proteine de transport membranar* care leagă şi transportă, fie pasiv, fie specific, diferite clase de compuşi biologici. Unele transportă în sistem independent, nefiind condiţionate de alte sisteme, în timp ce altele sunt în interdependenţă funcţională, penetrarea unui compus sau element în interiorul celulei fiind condiţionată de părăsirea acesteia de către alt element, ca de pildă în relaţia $K^+/Na^+$ unde influxul de $K^+$ este obligatoriu asociat cu efluxul de $Na^+$. Transportul se poate face pasiv, în absenţa surselor de energie, sau activ, prin energie metabolică furnizată în majoritatea cazurilor de hidroliza ATP ca urmare a legării ei de către proteinele de transport. Unele proteine de transport membranar sunt de fapt enzime care nu modifică integritatea membranei, sau o pot modifica formând canale hidrofile, un fel de "pori" sau "tunele" prin care moleculele pot circula prin difuziune liberă de la exterior spre interiorul celulei. O mică parte dintre aceste canale sunt deschise în permanenţă, dar cea mai mare parte a lor se poate deschide sau închide, aşa cum se închide sau se deschide o uşă, fie sub acţiunea unui ligand legat la receptorul corespunzător, fie ca urmare a modificării încărcăturii de sarcină electrică.

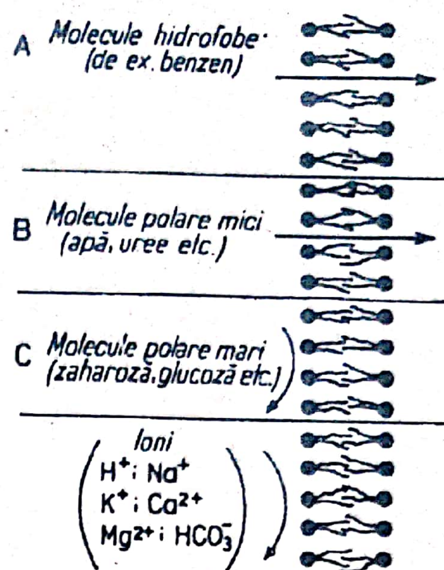



Fig.33. Posibilitatea traversării membranei plasmatice de către diferite tipuri de molecule sau ioni. Dublul strat lipidic poate fi uşor traversat de către moleculele hidrofobe (A) sau polare mici (B). Nu este traversată de către moleculele mari (C) sau ionii cu sarcină electrică mare (D) (după B. Alberts şi D. Bray).

Circulaţia transmembranară poate fi favorizată de ionofori de genul Gramicidinei A, Valinomycinei, A 23187 etc., nişte molecule hidrofobe mici care măresc permeabilitatea membranei sau formează pori în dublul strat lipidic al ei. Macromoleculele sau particulele mici, corpusculare, ca de pildă virusurile, bacteriile, fragmentele de celule eukariote sau chiar celulele întregi pot fi endocitate prin pinocitoză în cazul moleculelor solubile, sau prin fagocitoză în cazul fragmentelor sau celulelor bacteriene, eukariote etc., proces descris mai amănunţit la celulele fagocitare şi prezentatoare de antigen (APC). Deci, membrana celulară este un mozaic molecular la nivelul căruia au loc procese biochimice complexe, cu rol major în transferul de semnale informaţionale.

## CELULA MATCĂ

Toate celulele aflate în circulaţia sangvină, atât cele cu rol în apărarea imună cât şi cele care nu sunt implicate în acest gen de apărare, au o origine comună. Ele descind din celula matcă, cu denumirile sinonime de *suşă* sau, după terminologia anglo-saxonă, *stem* (tulpină). Este o celulă pluripotentă care apare prima în viaţa embrionară, iniţial în insulele sacului vitelin şi apoi în ţesutul hematopoietic al ficatului embrionar şi care, la adulţi, este prezentă în măduva oaselor late şi chiar în circulaţie, unde ar fi cca. 2-10 celule matcă la $1x10^6$ limfocite

imunocompetente. La copii există şi în măduva oaselor lungi, care însă cu vârsta îşi pierde funcţia hematogenă încărcându-se cu adipocite.

Celula matcă se înmulţeşte în absenţa stimulilor exogeni, generând progenitori din care, sub influenţa factorilor umorali locali, derivă toate celulele aflate în circulaţie. Morfologic nu poate fi deosebită de limfocitele imunocompetente, singura posibilitate de identificare a ei fiind cea de evaluare a capacităţii de proliferare *in vitro*, unde formează "colonii" în care există precursori multipli celulari. În linii mari, din colonia multipotenţială, cu celule nediferenţiate, apărută după diviziunea celulei matcă depozitară a informaţiei genetice, descind diverşi progenitori care trec mai întâi prin stadiul de "hemocitoblast".

Atât celula matcă, cât şi hemocitoblastul sau descendenţii acestuia, respectiv precursorii timpurii care formează coloniile (CFU = unităţi formatoare de colonii) sunt foarte sensibili la acţiunea radiaţiilor ionizante, dar rezistenţi la terapia cu citostatice. Aşa se face că, în cursul chimioterapiei mielosupresoare, în circulaţia sangvină se găseşte un număr sporit de progenitori hematopoietici sau chiar de celule matcă. Această observaţie şi-a găsit o aplicaţie practică majoră, sângele periferic de la bolnavii cu leucemie, trataţi cu diferite citostatice, în care au rămas nealterate celulele matcă formatoare de colonii, fiind folosit ca sursă regeneratoare de progenitori celulari.

Deci, celula matcă este dotată cu o dublă potenţialitate: a) de autoregenerare şi b) de diferenţiere şi generare a populaţiilor celulare din circulaţie. Macanismele care controlează această dublă potenţialitate nu sunt cunoscute, dar se ştie că între celula matcă, celulele stromei şi diferite citokine se instalează un ansamblu complex de interacţiuni care controlează proliferarea şi diferenţierea precursorilor celulari derivaţi din ea. "Celule stromale" este un termen generic care defineşte celulele ţesuturilor fixe, nehematopoietice din cavitatea medulară. În această cavitate sau "stromă", există multe tipuri diferite de celule.

Se pare că hemocitoblaştii au la nivelul membranei lor nişte receptori care-i vor angaja pe căi "predestinate" spre locuri unde se vor matura funcţional descendenţii lor. La nivelul acestor locuri, de fapt organe limfoide primare, către care sunt orientaţi, aceşti progenitori vor găsi condiţii de microclimat corespunzător. În realitate, aceste "condiţii" sunt realizate, printre altele, de către o serie de molecule, elaborate şi parţial cantonate în aceste organe pentru care hemocitoblaştii au receptori de recunoaştere care-i vor călăuzi cu precizie la destinaţie, datorită unui proces de *ecotaxie*, de "plecare către casă" (gr. *oikos* = casă + *taxis* = mişcare). Ecotaxia este prezentă nu numai la celulele tinere, ci şi la limfocitele mature funcţional care recunosc ariile de dependenţă de la nivelul organelor limfoide secundare.

Astfel, maturarea precursorilor eritrocitari se face sub influenţa *eritropoietinei,* a celor granulocitari sub cea a *granulopoietinelor,* a limfocitelor *T* în prezenţa *timopoietinei* etc. Absenţa acestor factori sau a organelor la nivelul cărora se maturează progenitorii celulari duce la imposibilitatea maturării lor şi, implicit, la grave tulburări funcţionale, dintre care unele sunt incompatibile cu viaţa. De exemplu, atimia congenitală face imposibilă maturarea celulelor *T* şi, ca atare, aboleşte toate funcţiile imune, dependente de această clasă de limfocite. Dar aceleaşi rezultate se constată şi în caz de defecte de sinteză a timopoietinei, chiar dacă timusul este prezent. Celulele descendente din "matcă" pot fi lipsite de atribute imune, cum este cazul hematiilor, pot avea funcţii de apărare nespecifică, cum este cazul granulocitelor PMN, sau pot avea în exclusivitate funcţii de apărare imună, prototipul acestora fiind limfocitul. Deci, din celula matcă plurifuncţională descind dierite tipuri de celule, care aparţin seriilor *eritroidă, megakariocitară, granulocitară, mieloidă* şi *limfoidă* (fig. 34).

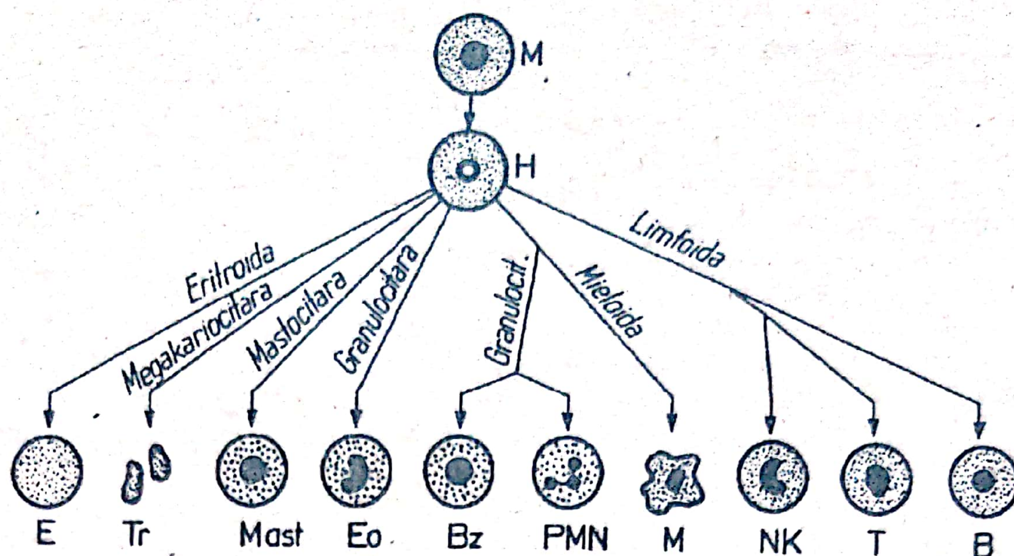



Fig.34. Liniile celulare descendente din celula matcă (M) şi hemocitoblast (H). E=eritrocite; Tr=trombocite; Mast=mastocite; Eo, Bz, PMN=granulocite eozinofile,bazofile sau polimorfonucleare neutrofile; M=monocite-macrofage; NK=celule *NK*; T,B=limfocite *T* sau *B* .

## CELULELE SERIEI ERITROIDE

Eritrocitele derivă din eritroblastele descendente din hemocitoblaşti. La maturitate au un diametru de 4-8 $\mu$ şi sunt încărcate cu hemoglobină formată din *hem,* sau gruparea prostetică, un. pigment bogat în ioni de $Fe^{2+}$ sau $Fe^{3+}$, şi o componentă proteică denumită *globină.* Rolul esenţial al eritrocitelor este acela de a transporta, de la ţesuturi şi către ele, $O_2$ şi $CO_2$.

La om, într-un ml de sânge există cca. $5x10^9$ hematii, iar în întregul organism, deci la cca. 5 litri de sânge, în jur de $5x10^{14}$ elemente.

Hematiile trăiesc între 15 şi 160 de zile, distrugerea lor făcându-se printr-un proces de *hemoliză fiziologică,* proces care are loc la nivelul splinei.

Nu au rol în procesele de apărare imună. Se pare însă că, cel puţin *in vitro*, ele pot asigura condiţii favorabile exprimării unor funcţii ale limfocitelor. Astfel, proliferarea policlonală a limfocitelor stimulate *in vitro* cu diverşi mitogeni este mai activă atunci când în mediul de cultură se găsesc şi hematiile subiectului respectiv, indicele de transformare blastică fiind mai mare în comparaţie cu cel înregistrat în culturile de limfocite fără hematii. Probabil că prezenţa lor anulează unele efecte negative exercitate de către pereţii vaselor de cultură, în special ai celor refolosite şi mai uzate, asupra membranei celulare.

## CELULELE SERIEI MEGAKARIOCITARE

Trombocitele au un rol periferic în apărarea imună. Din matcă, sub influenţa *trombopoietinei,* derivă megakariocitul care, după mai multe diviziuni rapide se transformă în decurs de cca. 24 de ore în trombocite cu funcţii majore în coagularea sângelui. Trombocitele aderă la nivelul leziunii vasculare şi eliberează factori care concură la transformarea fibrinogenului în fibrină.

Sunt bogate în amine vasoactive de genul histaminei, serotoninei etc., pe care le eliberează în cantităţi mari în circulaţie. Participă la instalarea hipersensibilităţii imediate de tip I mediată prin anticorpi IgE, responsabilă de creşterea permeabilităţii capilarelor şi contractarea muşchilor netezi ai bronhiilor, uterului etc.

Stimulate cu ionoforul de $Ca^{2+}$ A 23187, cu trombină sau colagen, eliberează *factorul de agregare a trombocitelor* (PAF), un potent mediator lipidic care acţionează asupra lor după legarea la un receptor cuplat cu inozitol-fosfolipid-fosfodiesterază. Acest factor, care din punct de vedere chimic este 1-0-alchil-2(R)-acetil-SN-glicero-3-fosforilcolină, este în mare parte responsabil de generarea fenomenelor menţionate mai sus, inclusiv de tromboza arterială, de şoc endotoxic, boli alergice acute etc. În afară de trombocite, el mai este eliberat şi de către leucocitele *PMN*, monocite, macrofage, mastocite, eozinofile etc., stimulate cu zimozan, IgE, ionofori etc.

Procesele inflamatorii generate creează condiţii improprii de viaţă paraziţilor sau bacteriilor, protejând nespecific organismul de agresiunea lor. Prin efectul său reglator asupra producţiei de IL-1 şi IL-2, trombocitele participă indirect la procesele de apărare imună; la concentraţii picomolare PAF stimulează sinteza de IL-1, pe când la concentraţii mai mari, micromolare, o inhibă. De altfel, funcţiile trombocitelor sunt mai complexe. De pildă, la fiinţele aflate pe o treaptă inferioară de evoluţie filogenetică, chiar şi la păsări, ele ar avea şi funcţii fagocitare.

## CELULELE SERIEI GRANULOCITARE

Granulocitele asigură "prima linie de apărare" a organismului faţă de bacterii, fungi, virusuri şi paraziţi. Ele reprezintă cca. 50-70% din totalul leucocitelor circulante, în condiţii normale existând între $4x10^6$ şi $8x10^6$ celule/ml de sânge. Sunt localizate în ţesuturi, prezenţa lor în circulaţie fiind efemeră. O celulă, după ce a părăsit torentul circulator şi a pătruns în ţesuturi, nu mai revine în circulaţie.

Pe baza caracterelor morfologice, funcţionale şi de afinitate tinctorială, granulocitele pot fi împărţite în trei populaţii distincte a căror maturare funcţională este controlată de către granulopoietine diferite, dar care au o greutate moleculară identică (40-45 kD): a) *eozinofilele,* care descind direct din seria granulocitară, b) *bazofilele* şi c) *neutrofilele,* care descind dintr-o linie granulocitară derivată din seria mieloidă, cu un număr mai mare de faze de maturare, fapt care ar sugera apariţia lor mai târzie în cursul evoluţiei filogenetice.

În cursul maturării lor, bazofilele şi neutrofilele trec succesiv prin fazele mieloblast → promielocit → mielocit → metamielocit → granulocit segmentat.

## EOZINOFILE

Granulocitele eozinofile sunt celule relativ mari, cu diametrul de 10-15 $\mu$, cu un nucleu bilobat şi cu o citoplasmă cu granulaţii corpusculare de culoare portocalie bogate în fosfatază acidă, glicuronidază, catepsină, ribonuclează etc., cunoscute şi sub denumirea de "granulaţii eozinofile".

Granulocitele se formează în măduva osoasă, de unde trec în ţesuturi ca o populaţie eterogenă, cu subpopulaţii celulare cu densităţi diferite: "normodense" la subiecţii normali şi "hipodense" la hipereozinofilicii cu boli alergice sau cu unele infecţii parazitare.

Se deosebesc de granulocitele PMN nu numai prin granulaţiile lor, dar şi prin distribuţia lor predominant tisulară (doar 1% se află în circulaţie), prin receptorii de pe membrana plasmatică şi în special prin asocierea lor la infecţiile parazitare, la reacţiile inflamatorii cronice şi la manifestările alergice.

Aceste celule fagocitează bacterii, fungi şi în special complexe antigen-anticorp, contribuind la diminuarea efectelor negative ale acestora. Au un aparat Golgi dezvoltat, numeroase mitocondrii, iar la nivelul membranei, receptori *Fc* prin intermediul cărora realizează atât fagocitoza complexelor antigen-anticorp, cât şi citotoxicitatea anticorp-dependentă, salutară în protecţia organismului faţă de unii paraziţi cum ar fi *Schistosoma mansoni.*

La adulţi, sunt produse în măduva osoasă şi reprezintă cca. 3-6% din totalul populaţiei granulocitare. Numărul lor însă, atât în ţesuturi cât şi în circulaţie, poate fi modificat în cursul infecţiilor parazitare, bolilor neoplazice sau proceselor idiopatice. Prezenţa eozinofilelor în cantitate mare într-un anumit loc din organism indică o reacţie locală inflamatorie. De exemplu, în infecţiile cu helminţi există o pronunţată eozinofilie intestinală, iar în jurul metazoarelor se pot forma chiar granuloame eozinofilice.

Localizarea lor tisulară este sub controlul limfocitelor *T* care eliberează mediatori umorali cu acţiune directă asupra depozitului de eozinofile din măduvă. Este cazul EO-GSF (factorul de stimulare a creşterii eozinofilelor) şi EO-CSF (factorul de stimulare a coloniilor de eozinofile). Tot limfocitele *T* ar elibera şi un "factor de diferenţiere a eozinofilelor" (EDF), prezent în serul celor cu infecţii parazitare, care stimulează geneza şi maturarea precursorilor lor. Unii susţin că granulocitele eozinofile sunt descendente directe ale seriei granulocitare.

După alţii, se pare că ar exista un progenitor comun din care ar descinde atât eozinofilele cât şi bazofilele. Sub influenţa factorilor eozinopoietici secretaţi de către diferite subpopulaţii de limfocite *T,* în special de către limfocitele *T* supresoare şi a IL-1 şi IL-2, are loc proliferarea şi maturarea lor. De fapt, limfocitele *T*s pot activa *in vitro* şi multiplicarea neutrofilelor şi macrofagelor. Diferenţierea lor este sub controlul unor citokine, dintre care mai cunoscute sunt IL-3, IL-5, GM-CSF, rol foarte important revenind IL-5. Ca şi granulocitele PMN, eozinofilele exprimă pe suprafaţa lor molecule de adeziune ($\beta_2$ -integrine, LFA-1, Mac-1) şi receptori pentru selectine. Factorul de aglutinare a trombocitelor (PAF) şi componenta $C_5$a a complementului sunt chemoatractanţi pentru aceste granulocite.

Aceste celule conţin diferite proteine, ca de pildă "proteina de bază majoră" (MBP), peroxidaze, proteine cationice, neurotoxine, lizofosfolipaze etc. La nivelul membranei au antigene şi receptori a căror exprimare este în mare măsură condiţionată de activarea celulei (tabelul 15). De exemplu, receptorii Fc$\gamma$RI, Fc$\gamma$RIII, Fc$\varepsilon$RI, IFN$\gamma$. IL-2R sunt slab exprimaţi pe celulele neactivate, dar foarte intens pe cele stimulate. După activare, în special prin IgE, eozinofilele secretă proteine granulare, proces complex care în unele evenimente poate avea loc în câteva secunde iar în altele, în câteva ore. Secretă de pildă PAF (factorul de aglutinare a trombocitelor) care stimulează eliberarea de $O_2^-$ şi are efecte autocrine, fiind unul dintre cele mai importante semnale activatoare pentru aceste celule. Activarea lor ar fi rezultatul fosforilării proteinelor şi în special a tirozinei, cu rol reglator în transmiterea semnalelor.

Exprimarea glicoproteinei 120 (gp 120) pe suprafaţa eozinofilelor, glicoproteină cunoscută ca fiind receptor pentru HIV pe limfocitele *T* umane, sugerează posibilitatea funcţionării acestor celule ca adevărate rezervoare de virus în organismul infectat.

**Exprimarea unor molecule şi receptori pe membrana eozinofilelor activate sau aflate în repaus**

| Denumirea moleculei sau a receptorului | Structura recunoscută de către receptor |
|---|---|
| Receptorul *Fcγ*I (*Fcγ*IR) | Fragmentul cristalizabil al moleculei de IgG (monomer) |
| Receptorul *Fcγ*II (FcγIIR) | Fragmentul *Fc* al IgG polimer |
| Receptorul *Fcγ*III (FcγIIIR) | Fragmentul *Fc* al complexelor de IgG |
| *Fcε*R | Fragmentul *Fc* al IgE |
| Receptorul *Fcα*R | Fragmentul *Fc* al IgA |
| Receptorul *Fcμ*R (?) | Fragmentul *Fc* al IgM |
| Receptorul pentru interferon | Interferonul *γ* (IFN*γ*) |
| Receptorul pentru complement (tip I) | Componenta *C*3b a complementului |
| Receptorul pentru complement (tip 3) | Componenta *C*3b inactivată a complementului (iC3b) |
| Glicoproteina 120 (gp120) | Virusul imunodeficienţei umane (HIV) |
| Receptorul pentru IL-2 (IL-2R) | Lanţul *β* al moleculei de IL-2 |
| Receptorul pentru IL-3 | Interleukina-3 (IL-3) |
| Receptorul pentru IL-5 | Interleukina-5 (IL-5) |
| Receptorul pentru histamină | Histamina |
| Receptorul pentru estradiol | Estradiolul |
| Receptorii pentru glicocorticoizi | Glicocorticoizii |
| Receptorii pentru leucotriene | În special leucotriene *B*4 (LTB4) |
| Receptorul pentru ECF-A | Factorul chemotactic al anafilaxiei |
| Receptorul pentru VLA-6 | Integrina VLA-6 |
| Molecula de adeziune LFA-1 | ICAM (molecule de adeziune intercelulară) |
| Molecule de adeziune MAC-1 | ICAM-1; iC3b |
| Integrinele VLA-4 | Fibronectina |
| Moleculele de adeziune la celulele vaselor (VCAM-1) | Celulele endoteliilor vasculare |

Prin degranulare, eozinofilele eliberează diferite enzime şi în special MPB (proteina bazică majoră) care poate leza o varietate de celule, fiind principala proteină efectoare a lor, EPO (peroxidaza eozinofilelor) care lezează direct ţesuturile, EDN (neurotoxină derivată din eozinofile), toate activând eliberarea de histamină de către mastocite, iar unele dintre ele având chiar şi efecte citotoxice (tabelul 16).

Tabelul 16

**Caracteristicile unor mediatori secretaţi de către eozinofile**

| Mediatorul | Denumirea completă | Principalele caracteristici fizico-chimice şi funcţii biologice |
|---|---|---|
| ECF-A | Eosinophil chemotactic factor to anaphilaxis | - Sunt identificate două peptide acide cu greutate moleculară de 360-100 D:<br>a) Val-Gly-Ser-Glu<br>b) Ala-Gly-Ser-Glu<br>- Activitate chemotactică şi chemocinetică |
| ECP | Eosinophil cationic protein | - O familie de molecule bazice cu 21 de reziduuri de Arg şi greutatea moleculară de 16-20 kD care leagă $Zn^{2+}$<br>- Reprezintă cca. 30% din conţinutul granulelor<br>- Se găseşte sub formă de precursor care-şi definitivează structura în timpul secreţiei<br>- Nu are activitate bactericidă, dar este citotoxică pentru *Schistosoma mansoni* |
| MBP | Major bazic protein | -Polipeptid cu greutatea moleculară de 9300 D, bogat în Arg<br>- Reprezintă mai mult de 50% din proteinele granulare<br>- Omoară larvele de *Schistosoma mansoni, Trichinella spirallis, Trypanosoma cruzi*<br>- Provoacă leziuni ale epiteliului |
| EP-X | Eosinophil protein X | - Neurotoxină puternică (ca şi EDN=eosinophil derived neurotoxin)<br>- Greutatea moleculară 18,4 kD |
| EPO | Eosinophil peroxidază | - O glicoproteină formată din cel puţin două subunităţi cu greutate moleculară între 15-50 kD<br>- Ar modula reacţiile de hipersensibilitate şi antiparazitare. |

"Proteina bazică majoră" (MPB) este o proteină cationică capabilă să lege şi să inactiveze heparina, responsabilă de dermatita atopică în alergia alimentară, ca urmare a lezării epiteliului gastro-intestinal, sau de lezarea epiteliului bronşic şi de patologia asociată astmului bronşic cronic. Rolul ei în reacţiile alergice ar fi expresia potenţialului de neutralizare a heparinei. La pacienţii cu infecţii helmintice, cu astm bronşic sau cu sindrom hiper-eozinofilic, apar în circulaţie celule cu densitate şi funcţii diferite de cele existente la subiecţii normali. Aceste celule exprimă un număr mai mare de receptori *Fc* şi receptori pentru complement, au mai puţine granule, probabil datorită degranulării parţiale, produc cantităţi mai mari de $O_2$, au mai multă fosfatază acidă lizozomală şi sunt mult mai eficiente în funcţia lor citotoxică antiparazitară.

Pentru aceasta, ele şi precursorii lor sunt activate de către leucetriena LTB4 secretată de neutrofile, de ECFA-A şi PAF eliberate de mastocite precum şi de către diverşi factori secretaţi de limfocitele *T*. De altfel, există o cooperare şi o

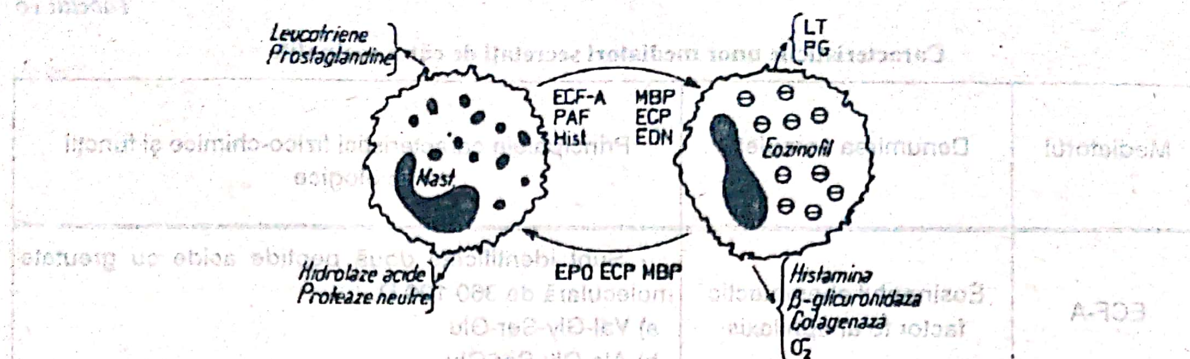



Fig.35. Relaţii funcţionale stabilite între mastocite (Mast) şi eozinofile. ECP=proteina cationică a eozinofilelor; EDN=neurotoxina derivată din eozinofile; EPO=peroxidaza eozinofilelor; H=histamina; MBP=proteina bazică majoră; PAF=factorul de agresare a trombocitelor. Mastocitele şi eozinofilele se influenţează reciproc la locul inflamaţiei, eliberând mediatori solubili care vor provoca leziuni tisulare (după D.D.G.Lee şi col.).

influenţare reciprocă între eozinofile şi mastocite (fig. 35) sau între acestea şi diferite alte celule, în urma cărora are loc diferenţierea precursorilor şi eliberarea mediatorilor de către eozinofilele mature.

În afară de activarea prin produsele altor celule, eozinofilele pot fi activate şi de către complexele imune, în special de acelea în care anticorpii s-au fixat pe suprafaţa parazitului. În astfel de situaţii, ele se fixează prin receptorul *Fc* la imunoglobuline şi eliberează mediatorii care vor ucide parazitul sau vor activa peristaltismul intestinal. De asemenea, IgE citofilic legat la receptorul *Fc (FcR)* poate fi activat de către antigen şi la rândul său poate activa celula, care va induce prin produsele sale de secreţie starea de hipersensibilitate.

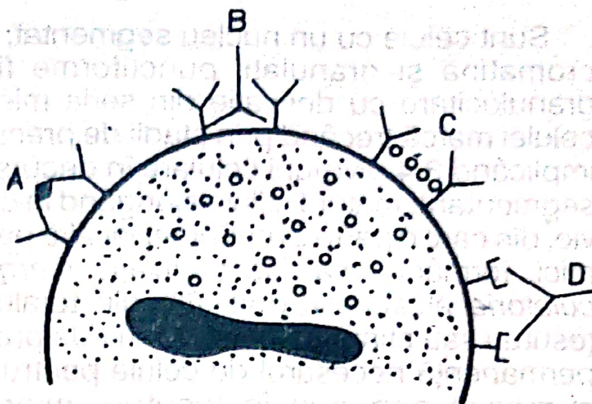
În concluzie, se poate afirma că eozinofilele sunt celule efectoare cu rol major în hipersensibilitatea dependentă de moleculele de IgE care le induc eliberarea de PAF, EPO etc., dar care au şi funcţii reglatorii în acest tip de hipersensibilitate, în special prin influenţa lor asupra eliberării histaminei de către mastocite şi bazofile. Totodată, au efecte citotoxice asupra unor celule epiteliale de la nivelul endoteliilor, traheei sau bronhiilor şi sunt principalele celule efectoare ale citotoxicităţii mediate celular anticorp-dependente (ADCC) în unele parazitoze.

## BAZOFILE

Granulocitele bazofile se diferenţiază şi se maturează în măduva osoasă de unde ajung în circulaţia sangvină, fără a cantona în ţesutul conjunctiv. Sunt celule cu un nucleu bilobat, cu cromatină periferică densă, cu granule mari de culoare violet-închisă, care maschează nucleul. Au funcţii fagocitare reduse, intervenind în special în procesele de apărare imună nespecifică, de tip inflamator, cu referire specială la reacţiile anafilactice ale hipersensibilităţii de tip imediat. Conţin lizofosfolipide, fiind din acest punct de vedere similare biochimic cu eozinofilele. Sunt bogate în glicozo-aminoglicani, dar lipsite de heparină.

Pe suprafaţa membranei lor au între 6 000 şi 600 000 de receptori pentru IgE care leagă aceste molecule cu înaltă afinitate ($10^{-9}$ - $10^{-10}$ $M^{-1}$ constanta de echilibru). Legarea la aceşti receptori este urmată de *degranularea bazofilelor*, un proces biologic în cursul căruia sunt eliminaţi mediatorii activi. De asemenea, au receptori pentru *Fc* a IgG şi pentru fragmentul *C3b* al complementului, cu rol

Fig.36. Diferite posibilităţi de legare încrucişată a receptorilor pentru moleculele de IgE care să inducă activarea funcţională a bazofilelor şi implicit degranularea lor.
A-legare prin antigen polivalent; B-legare prin anticorpi anti-moleculele de IgE ataşate citofil la membrana celulară; C-legare prin lectine; D-prin anticorpi anti-receptori pentru IgE.




important în declanşarea eliberării unor mediatori responsabili de fenomene de hipersensibilitate.

Degranularea, adică eliberarea extracelulară a conţinutului granulelor bogate în histone, peroxidază, dehidrogenază, histidin-decarboxilază, acid mucopolizaharidic etc., este un proces fiziologic complex care necesită atât legarea alergenului la receptor, cât şi "aglomerarea" receptorilor. Această aglomerare provoacă o schimbare conformaţională la nivelul membranei plasmatice care activează sistemele enzimatice intracelulare, culminând cu eliminarea mediatorilor hipersensibilităţii de tip imediat, fenomen întâlnit şi la mastocite şi eozinofile. În linii mari, există diferite modalităţi de activare a acestor celule, toate având însă la bază legarea încrucişată (aglomerarea) a doi sau mai mulţi receptori. Aceasta se poate realiza prin unirea a doi receptori *Fc* pentru IgE de către anticorpii anti-IgE, prin lectine etc. (fig. 36).

Legarea încrucişată a receptorilor este urmată de o serie de evenimente biochimice în care cAMP joacă un rol reglator crucial. Unirea receptorilor activează fie o serin-esterază, fie o protein-kinază dependentă de cAMP. Acestea, la rândul lor, activează diverse transferaze care vor controla metilarea fosfolipidelor membranei, însoţite de perturbarea şi deschiderea canalelor de $Ca^{2+}$. Odată canalele deschise, are loc influxul ionilor de $Ca^{2+}$, care se menţine atât timp cât antigenul este prezent la nivelul receptorilor, ionii de Ca extracelular şi ATP constituind sursele majore de energie ale celulei. În stadiul următor, $Ca^{2+}$ activează o enzimă, fosfolipaza $A_2$ ($PLA_2$), care catalizează hidroliza acizilor graşi şi eliberarea acidului arahidonic, precursor al leucotrienelor, prostaglandinelor şi lizofosfatidil-colinei, care ar facilita procesul de degranulare.

Acest proces este specific, iar intensitatea eliberării corelează cu intensitatea manifestărilor clinice, fiind folosit ca test *in vitro* pentru diagnosticul alergiilor.

## NEUTROFILE POLIMORFONUCLEARE (PMN)

Reacţiile inflamatorii acute se caracterizează prin aflux leucocitar, edeme şi eliberare de mediatori solubili. Caracteristica majoră a inflamaţiei este infiltrarea leucocitară, care debutează cu afluenţa granulocitelor şi în special a granulocitelor PMN atrase aici de către factorii chemotactici eliberaţi, probabil, iniţial de către agentul străin pătruns în intimitatea ţesuturilor, cum ar fi bacteriile, virusurile, paraziţii şi de către mastocite, iar apoi şi de către alte celule. În general granulocitele şi în special cele PMN joacă un rol important în distrugerea microorganismelor, fiind implicate în procese inflamatorii acute şi cronice, cum este cazul unor boli autoimune. În acest scop, ele sunt înzestrate cu o mare capacitate de recepţie a stimulilor chemotactici, cu o mare mobilitate şi cu funcţii fagocitare foarte active.

Sunt celule cu un nucleu segmentat, cu 2-6 lobi uniţi prin filamente subţiri de cromatină şi granulaţii punctiforme fine, de culoare brună. Aparţin seriei granulocitare cu derivaţie din seria mieloidă, evoluţia lor de la descendentele celulei matcă trecând prin stadii de precursori mieloblaşti promielociţi şi mielociţi, implicând 3-4 diviziuni celulare în decurs de 7 zile. În alte 7 zile, realizează forma segmentară, matură, zilnic ajungând în circulaţie cca. $1,5 \times 10^9$ celule/kg greutate vie, din care o parte circulă liber iar altă parte aderă la suprafaţa endoteliilor vaselor mici, formând aşa-zisa *populaţie marginală,* care împreună cu *populaţia circulatorie* alcătuiesc doar 6% din totalul neutrofilelor, restul fiind cantonate în ţesuturi sau aflându-se sub formă de precursori în mitoză. Acest "atac" asigură în permanenţă necesarul de celule pentru populaţia marginală, deoarece aceasta migrează continuu în ţesuturi, migrare aflată sub influenţa unor factori chemotactici.

Neutrofilele sunt celule cu viaţă scurtă: în mod normal se găsesc în circulaţie cca. 12 ore, după care trec în ţesuturi unde stau cantonate timp de 2-4 zile, fiind înlocuite cu altele tinere. Această populaţie granulocitară se caracterizează printr-o dezvoltată capacitate de locomoţie, o mare capacitate de aderare la suprafeţe şi un bogat echipament de enzime l izozomale care pot "arde" materialul fagocitat.

Odată ajunsă în circulaţie, aderă la endoteliul peretelui vascular, pe care-l traversează graţie posibilităţii de a se "strecura" printre celulele pereţilor vaselor, cu ajutorul pseudopodelor emise ca urmare a atracţiei "chemotactice" exercitată de către factorii chemotactici eliberaţi de bacterii, alte celule vii, sau de către celulele necrozate. Au o capacitate de locomoţie rapidă datorită unor microfilamente contractile formate din actină şi miozină, care polimerizează atunci când factorii chemotactici se fixează la nivelul receptorilor de membrană. Factorii care determină abilitatea circulatorie a lor nu sunt complet cunoscuţi, dar faptul că PMN pot traversa capilare care au un diametru mai mic decât ele dovedeşte că aceste celule trebuie să se "deformeze" pentru a realiza traversarea. Dacă nu se deformează, ele rămân cantonate în vase pentru o perioadă variabilă de timp. Aceasta se întâmplă când au ajuns la locul procesului infecţios unde "deformabilitatea" lor scade, ele nemaiputând părăsi locul de "sechestrare". Întregul proces este determinat de modificările în organizarea actinei citoscheletului celular şi, deci, de modificările proprietăţilor mecanice ale celulei (fig. 37).

Actina, o proteină prezentă în citoplasma tuturor celulelor, este componenta majoră a microfilamentelor. Se găseşte sub două forme, una globulară denumită şi "actina-G", şi alta filamentoasă sau "actina-F". Ca răspuns la diferiţi factori chemotactici, au loc rapid conversia actinei-G în actină-F şi polimerizarea filamentelor de actină, implicate în diferite funcţii celulare cum ar fi chemotactismul, secreţia de granule, mobilitatea receptorilor de membrană etc. Polimerizarea filamentelor de actină este un proces reversibil şi localizat într-o anumită regiune a celulei, în special în aria cu activitate locomotorie mare, adică acolo unde se

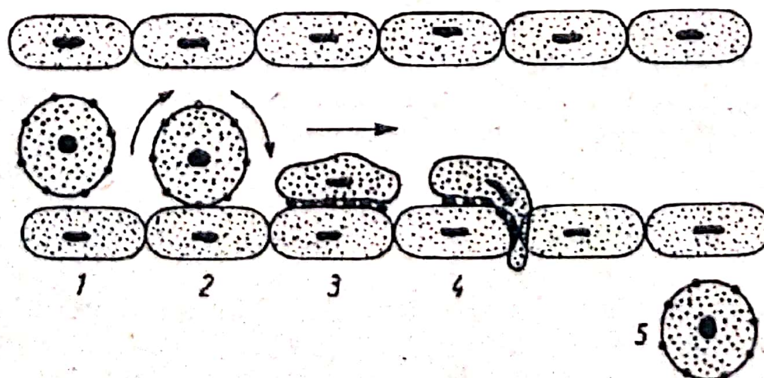


Fig.37. Diferite momente ale circulaţiei granulocitelor PMN intra- şi extravascular.

emit pseudopode. Ataşarea la suprafeţele solide este o condiţie *sine qua non* a locomoţiei: după ce au aderat, celulele proiectează o porţiune a lor – un "protopod" – în direcţia semnalului chemotactic, în timp ce capătul ei opus rămâne ataşat la suport (celule endoteliale), ataşare realizată graţie unor diverse molecule de adeziune prezente pe membrana PMN sau pe celulele endoteliale (tabelul 17). Ar fi o succesiune de evenimente biochimice în care ar intra în scenă diferite enzime şi molecule de adeziune.

*Tabelul 17*

**Molecule de adeziune cu rol în aderarea granulocitelor polimorfonucleare la endoteliul vascular**

| Familia | Moleculele | Unele caracteristici ale lor |
|---|---|---|
| P-Selectine | GMP-140 | -Exprimate permanent pe celulele endoteliale |
| | CD 62 | - Constituenţi ai membranei PMN |
| E-Selectine | ELAM-1 | - Exprimate pe celulele endoteliale numai după inducerea sintezei lor |
| L-Selectine | LAM-1<br>LECAM-1 | - Constituenţi ai membranei PMN |
| Integrine | Mac-1<br>LFA-1 | - Exprimate pe granulocite şi monocite-macrofage |

În linii mari, evenimentele s-ar desfăşura în felul următor:

1. Iniţial, prin L-selectine, granulocitele PMN se leagă la membrana celulelor endoteliale. Această legare este slabă, aşa că, sub acţiunea curentului sangvin, PMN "rulează" pe suprafaţa endoteliului vascular.

2. Sub acţiunea unor atractanţi, cum ar fi NAP-1/IL-8 (neutral atractant activation protein-1 şi interleukina-8), se modifică forma celulelor ataşate, acestea suferind o rapidă activare însoţită de exprimarea lanţurilor $\alpha$ şi $\beta$ (CD11/CD18) ale integrinelor. Acestea realizează oprirea rulării şi adeziunea fermă a PMN la endoteliu.

3. NAP-1/IL-8 de pe suprafaţa endoteliului "rade" L-selectinele, modifică forma celulelor, făcându-le apte să traverseze peretele vascular. Prin intervenţia în secvenţe diferite a unor semnale asupra microfilamentelor de actină şi asupra moleculelor de adeziune, PMN aderă alternativ cu un pol sau altul al celulei, contractându-se în direcţia protopodului, moment în care celula trece de la forma rotundă, apropiind extremitatea posterioară fixată la endoteliu, adică "uropodul", de "protopod", după care urmează îndepărtarea protopodului şi alungirea ei şi aşa mai departe (fig. 38). Deplasarea acestor celule se face într-o manieră similară celei cunoscută la lipitori *(Hirudo medicinalis)*.

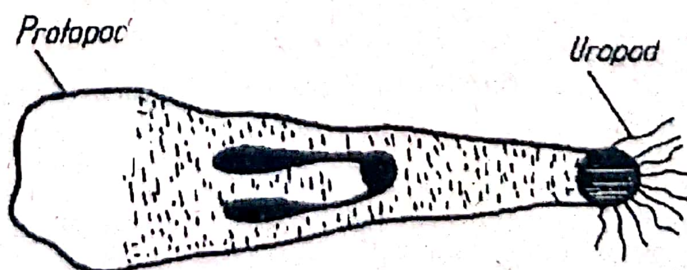



Fig.38. Fixarea la suprafeţe solide şi deplasarea granulocitului PMN. Cu ajutorul protopodului, celula se fixează la o suprafaţă. După fixare, îşi desprinde uropodul şi-l aduce în apropierea protopodului, fixându-l la ţesut; desprinde protopodul, celula extinzându-se, în felul acesta "înaintând" spre direcţia semnalată de factorii chemotactici.

Microorganismele pătrunse în intimitatea ţesuturilor, sau complexele antigen-anticorp formate local emit semnale chemotactice, prezenţa lor fiind imediat sesizată de către PMN care se deplasează activ în direcţia lor.

Se cunosc trei clase diferite de compuşi cu activitate chemotactică pentru neutrofile:

a. *Anafilatoxina C5a* care se formează *in vivo;*

b. fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanină) şi analogii ei;

c. Leucotriena B4 (LTB4), care este unul dintre cei mai potenţi mediatori ai inflamaţiei şi care poate provoca deplasarea PMN spre locul agresiunii, degranularea lor şi generarea speciilor active de oxigen.

Recunoaşterea şi fagocitarea materialului străin, în special a bacteriilor dar şi a celulelor mai mari cum ar fi eritrocitele etc. se face direct sau prin "opsonine", care sunt de fapt molecule de IgG sau de complement. Când particula care urmează a fi fagocitată s-a ataşat la suprafaţa membranei plasmatice, granulocitul PMN emite pseudopode care o înconjoară, prin fuzionarea acestora particula fiind înglobată într-o vacuolă denumită *fagozom.*

Granulele citoplasmei, bogate în proteine cu activităţi antimicrobiene, sintetizate încă din stadiile timpurii ale diferenţierii celulare, se deplasează şi fuzionează cu fagozomul, descărcându-şi rapid şi masiv conţinutul lor toxic. Neutrofilele umane conţin două tipuri diferite de granule care se formează în stadii diferite de maturare celulară.

Încă din stadiul de promielocit se formează "granulele azurofile" bogate în peroxidaze, o celulă matură conţinând cca. 1 000 de astfel de granule. În fazele timpurii ale maturării celulare, peroxidaza este prezentă nu numai în granule, care constituie locul final de depozitare a ei, ci şi în reticulul endoplasmic rugos, unde este sintetizată, şi în aparatul Golgi, unde este "împachetată".

În mielocite, un stadiu ulterior de maturare, apar "granulele specifice" sau "secundare", cele azurofile fiind mai puţine numeric. Echiparea PMN cu arsenalul enzimatic are loc în cursul maturării lor. Odată maturată, celula îşi pierde maşinăria necesară sintezei, căpătând în schimb caracteristicile esenţiale funcţiilor ei viitoare: capacitatea de a răspunde la semnale chemotactice, mobilitate şi funcţii fagocitare. Cele două tipuri de granule diferă ca mărime, putând fi separate prin fracţionări subcelulare, conţinutul lor diferind complet, cu excepţia lizozimului prezent atât în granulele azurofile cât şi în cele secundare sau în alte organite mici de depozitare (tabelul 18).

Granulele azurofile conţin o serie de enzime litice de genul hidrolazelor acide caracteristice lizozomilor, proteazelor serice cu *p*H neutru, lizozimului şi mieloperoxidazei, o enzimă nehidrolitică etc. Acest tip de granule este implicat atât în uciderea bacteriilor cât şi în digestia intracitoplasmatică a materialului fagocitat. Granulele specifice conţin colagenaze, lizozim, lactoferină şi proteine care leagă vitamina $B_{12}$ al căror rol biologic este încă puţin cunoscut. O a treia populaţie de granule este formată din particule subcelulare de depozitare, de dimensiuni mici, eterogene ca structură, conţinând unele hidrolaze acide, o mare parte din catepsinele B şi D şi proteinaza 3, o serin-protează care este prezentă şi în granulele azurofile. O localizare exclusivă la acest nivel are gelatinaza, o metalo-proteinază cu multiple funcţii biologice.

Uciderea bacteriilor fagocitate depinde de activarea enzimelor granulare şi a NADPH-oxidazei, urmată de eliberarea moleculelor toxice de oxigen.

Datorită funcţiilor fagocitare foarte active şi posibilităţilor mari de distrugere prin mecanisme oxigen-dependente şi independente ale materialului înglobat, neutrofilele joacă un rol important în procesele oxidative şi de "curăţire", fiind considerate pe nedrept "gunoierii organismului". Rolul lor în organism este mult mai complex.

*Tabelul 18*

**Localizarea subcelulară a enzimelor şi a unor constituenţi depozitaţi în neutrofilele umane (după M. Bagglioni şi col. şi R. Lehrer şi col.)**

| Clasa constituenţilor | Granule azurofile | Granule specifice | Organite mici de depozitare* |
|---|---|---|---|
| Enzime microbicidale | Mieloperoxidaze<br>Lizozim | Lizozim | |
| Proteinaze neutre | Elastaze<br>Catepsina G<br>Proteinaza 3<br>Colagenaza | Colagenaze<br>Gelatinaze | Gelatinază<br>Activator de plasminogen |
| Hidrolaze acide | N-acetil-glucozaminidază<br>Catepsina G<br>Catepsina D<br>$\beta$ -glicuronidaza<br>$\beta$ -glicerofosfatază<br>$\alpha$ -manozidază | | N-acetil-glucozaminidază<br>Catepsina B<br>Catepsina D<br>$\beta$ -glicuronidază<br>$\beta$ -glicerofosfatază<br>$\alpha$ -manozidază |
| Alţi constituenţi | Defensine<br>Azurocidine<br>BPT (factor de creştere a permeabilităţii bacteriilor) | Citocrom b 558<br>Lactoferină<br>Proteine care leagă vitamina $B_{12}$<br>Receptori chemoatractanţi<br>Receptori pentru adeziune | |

* Populaţii eterogene de organite (particule C şi vezicule secretorii) care ar fi purtători de gelatinază

În linii mari există două mecanisme microbicidale distincte: a) dependent de metabolismul oxidativ şi b) independent de acest metabolism. Aceste mecanisme, cu unele deosebiri, sunt caracteristice tuturor celulelor cu funcţii fagocitare (eozinofile, macrofage etc.) capabile de arderi respiratorii şi, după caz, de degranulări.

Metabolismul oxidativ-dependent necesită activarea NADPH-oxidazei, care implică un complex format din mai multe componente localizate în membrana PMN şi în special din flavoproteină şi un citocrom unic de joasă potenţialitate. Deci, activarea necesită prezenţa unei fracţiuni membranare asociată la o fracţiune citosolică, a acidului arahidonic şi ionilor $Mg^{2+}$.

La microscopul electronic se poate urmări procesul fagocitării şi se poate demonstra, prin colorarea peroxidazei, descărcarea granulelor azurofile, enzimele fiind eliberate rapid şi masiv, procesul începând încă înainte de înconjurarea completă a materialului fagocitabil de către pseudopodele membranare, deci

încă înainte de formarea fagozomului. De fapt sunt eliberate două clase de produse: unele preformate încă în cursul maturării celulei şi care sunt depozitate în organite şi altele sintetizate ca urmare a stimulării celulei de către materialul fagocitat (tabelul 19).

*Tabelul 19*

**Produse eliberate de către neutrofilele PMN umane stimulate consecutiv fagocitozei (după M. Bagglioni şi col. şi R. Lehrer şi col.)**

| Produse preformate | Sintetizate extemporaneu |
|---|---|
| - Gelatinaze şi alte enzime stocate în organitele secretorii mici | - Superoxidul, hidrogen-peroxidul, şi alţi metaboliţi ai oxigenului formaţi via NADPH-oxidază |
| - Proteinele de legare a vitaminei $B_{12}$, colagenaze, lactoferina şi lizozimul stocat în granulele secundare | - Produşii de oxigenare ai acidului arahidonic: $TxA_2$, $PGE_2$, $LTB_4$ |
| - Hidrolazele acide, mieloperoxidaza, serin-proteinazele neutre, lizozimul etc. | - PAF format prin activarea unei acetil-transferaze |

Speciile preformate sunt în special enzime şi alte macromolecule, iar cele nou-formate sunt molecule mici, derivate din metabolismul oxigenului şi produşii acidului arahidonic formaţi pe cale ciclo-oxigenazică (tromboxan, prostaglandine), sau lipooxigenazică (leucotriene). Formarea acestora din urmă este iniţiată de către activarea dependentă de stimul a enzimei NADPH-oxidazei care va genera superoxizi, o fosfolipază ($PLA_2$) ce va elibera acid arahidonic din fosfolipidele membranei şi o transferază care va acetila precursorii PAF (factorului de aglutinare a trombocitelor).

Prin activarea sistemului oxidativ, oxigenazele reduc un electron de la nivelul oxigenului, proces care duce la formarea anionului superoxid ($O^-_2$) care este în continuare redus de către enzima superoxiddismutază (SOD) în peroxid de hidrogen ($H_2O_2$), un puternic oxidant care poate distruge bacteria în prezenţa sau absenţa unor enzime lizozomale (mieloperoxidaze).

În afară de $O_2^-$ şi $H_2O_2$, în neutrofilele stimulate sunt şi alte specii de oxigen redus cum ar fi $^1O_2$ (singlet oxigen), $OH^-$ (ionul hidroxil) sau hidroxi- şi peroxi-radicali ($HO^\bullet$ şi $ROO^\bullet$) care, dacă sunt eliberaţi în exces, pot provoca injurii vasculare şi alte procese autoagresive.

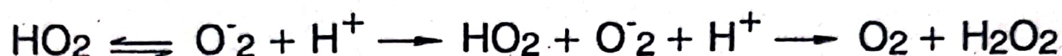
*Anionul superoxid* ($O_2^-$) este iniţial redus la expresia sa electronică cu rol oxidant şi reductor. Nu se ştie dacă funcţia sa citotoxică este exercitată direct de către el sau de către produsele pe care le formează, respectiv prin $OH^-$ şi posibil prin $^1O_2$. Superoxidul generat este convertit în derivaţii toxici $OH^-$ şi $H_2O_2$ care acţionează singuri sau în combinaţie cu alţi constituenţi ai granulocitelor, cum ar fi mieloperoxidaza (MPO) sau lactoferina. Combinaţia MPO cu $H_2O$ şi $Cl^-$ generează HOCl (acidul hipocloros) toxic. Este puseul respirator major, foarte eficace în distrugerea virusurilor, bacteriilor şi fungilor.

*Singlet oxigenul* ($^1O_2$). Oxigenul molecular conţine două valenţe sau, altfel spus, este bivalent. Când o absorbţie de energie smulge un electron de pe orbită,

rezultă $^1O_2$, o stare excitată a $O_2$. Sunt două forme de $^1O_2$, *delta* şi *sigma*, care-i exprimă energia prin emitere de lumină şi care ar reacţiona cu celulele sau cu produsele acestora, formând produse de excitaţie.

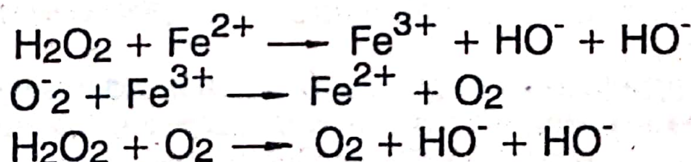
*Peroxidul de hidrogen* ($H_2O_2$) se poate forma fie direct din atomul de oxigen prin reducere bivalentă, fie prin formarea, într-o etapă intermediară, a $O_2^-$. De exemplu, glucozidaza pare să formeze $H_2O_2$ direct din $O_2$, pe când *xantinoxidaza* formează $H_2O_2$, cel puţin în parte, din $O_2^-$.

În leucocite, $H_2O_2$ s-ar forma prin dismutarea $O_2^-$ în mod spontan sau prin catalizarea de către enzima SOD la *p*H 4,8 conform reacţiei:



$$HO_2 \rightleftharpoons O^-_2 + H^+ \longrightarrow HO_2 + O^-_2 + H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2$$

Dismutarea spontană se pare că se face foarte rapid, deoarece *p*H-ul în vacuola fagocitară şi probabil şi în punctul de contact dintre ţintă şi leucocitul aderent este acid. În concentraţii mari, $H_2O_2$ este toxic pentru neutrofile şi ţesuturi, toxicitatea lui fiind amplificată de către unii agenţi cu greutate moleculară mică, de genul acidului ascorbic. Anularea toxicităţii se face prin metabolizarea şi transformarea sa în $H_2O$ şi O, via catalază şi glutation. $H_2O_2$ interacţionează cu $O_2^-$, dar această interacţie este prea lentă pentru a avea vreo semnificaţie biologică. De aceea, în proces intervin unele metale, ca de pildă $Fe^{2+}$, care poate fi oxidat de către $H_2O_2$ şi redus de către $O_2^-$ în maniera următoare:



$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^-$$
$$O^-_2 + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$
$$H_2O_2 + O_2 \longrightarrow O_2 + HO^- + HO^-$$

În afară de $Fe^{2+}$, mai intervin şi alţi ioni cum ar fi cei de $Cl^+$, $Br^+$, $I^+$ etc. De exemplu, peroxidaza se combină cu substratul ei ($H_2O_2$) formând un complex enzimă + substrat, care conduce la formarea unor agenţi cu proprietăţi toxice potente. Primul oxidant ar fi acidul hipocloros (HOCl) care, interacţionând cu $H_2O_2$, ar forma singlet oxigenul:



$$H_2O_2 + HOCl \longrightarrow {}^1O_2 + H_2O + Cl^-$$

Oxidanţii formaţi din ioduri pot include molecule de iod ($I_2$), iod ($I^+$), şi acid hipoiodos (HOI).

Condiţiile de anaerobioză reduc, dar nu abolesc, efectul bactericid al neutrofilelor deoarece acestea, pe lângă sisteme litice oxigen-dependente, au şi sisteme oxigen independente (tabelul 20).

Tabelul 20

**Sisteme antimicrobiene ale granulocitului neutrofil**

| În relaţie cu oxigenul | În relaţie cu enzime (peroxidaze) | Agentul litic |
|---|---|---|
| Dependente de oxigen | Mediat de mieloperoxidaze | $H_2O_2$ |
| | Independent de mieloperoxidaze | $H_2O_2$; $O_2^{-}$; $HO^{\bullet}$; $^1O_2$ |
| Independente de oxigen | | Acid hidrolazic<br>Proteinaze neutre<br>Proteine cation *<br>Colagenaze<br>Lizozim, lactoferină, gelatinaze, catepsină, glicerofosfataze |

* În cadrul acestor proteine sunt:

a. BPI (proteina care induce creşterea permeabilităţii bactericidale). Membrana externă a bacteriilor devine permeabilă pentru moleculele hidrofobe datorită lezării ei;

b. Proteine antimicrobiene azurofile derivate (lipsesc la bolnavii cu boala Chediak-Higashi care suferă de infecţii cronice cu *S. aureus* );

c. Catepsina G cu activităţi esterazice de genul chemotripsinei, inhibitoare a sintezei macromoleculelor şi a consumului de oxigen. Este activată de bacteriile Gram+;

d. Defensinele eliberate ca răspuns la stimulii macromoleculari şi celulari cu efect citotoxic pentru multe celule normale sau transformate neoplazic.

De altfel, chiar şi bacteriile au susceptibilităţi diferite la mecanismele litice ale acestor celule. De exemplu, cele care produc catalază şi pot degrada $H_2O_2$ sunt mai rezistente la sistemul $H_2O_2$ mediat de peroxidază decât cele care nu produc catalază.

Dar, în linii mari, radicalii de oxigen catalizează peroxidarea lipidelor, lezionarea ADN, degradarea şi distrugerea proteinelor, toate acestea ducând la moartea bacteriei. Conţinutul granulelor PMN rămâne probabil inert atât timp cât membrana plasmatică a celulei este intactă. Dar, imediat ce aceasta este stimulată de prezenţa unor particule străine, are loc "degranularea" prin fuziunea granulelor fie cu membrana perivacuolară a fagozomului, fie cu cea plasmatică a celulei şi vărsarea conţinutului lor în vacuole sau extracelular. Se pare că degranularea granulelor azurofile şi a celor secundare se face independent, factorii opsonici influenţând granulele care urmează să fuzioneze cu fagozomii. De exemplu, fagozomii care conţin bacteriile *S. typhimurium,* opsonizate prin fracţiunea *C*3a a complementului, produc defensine dar nu şi lactoferină sau proteine care leagă vitamina $B_{12}$. Acestea vor fi prezente în fagolizozom numai dacă opsonizarea s-a făcut prin receptorii *Fc* ai IgG.

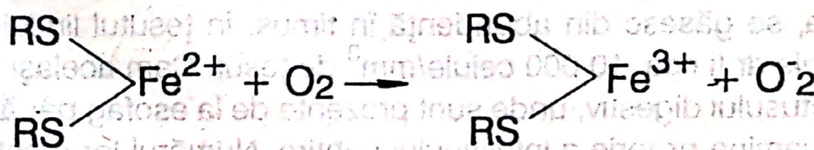
Vacuolele fagocitare nu au un *p*H prea acid: în primele 15-45 de minute după formare sunt neutre, pentru ca ulterior să se înregistreze o uşoară acidifiere, *p*H-ul scăzând la 6. Acidifierea prematură este în detrimentul activităţii antimicrobiene, fiind frecventă la persoanele cu boala granulomatoasă cronică. Granulocitele PMN acţionează ca elemente active şi bine integrate în sistemul de apărare imun, fiind în interdependenţă cu alte populaţii moleculare, dar şi sub controlul acestora. În cazul unor deficite ale funcţiilor de control, cum se observă uneori în clinică, se ajunge la hiperoxie cu producerea de leziuni grave ale pulmonului, cordului, creierului etc. Hiperoxia se produce atunci când rata crescută a producţiei

speciilor de oxigen depăşeşte mecanismele de epurare a lor. Se ajunge la creşterea permeabilităţii pentru ioni a ţesuturilor endoteliale şi epiteliale ale pulmonului, cu apariţia edemului interstiţial şi alveolar, la hemoragii pulmonare sau, în cazul neuronilor, la convulsii cerebrale. Primul eveniment care generează leziunile este producerea în exces a oxigenului şi scăderea eficienţei mecanismelor antioxidante ale organismului. Rata crescută a producţiei de specii toxice de oxigen se poate instala şi în unele stări patologice cum ar fi în ischemie (în special după infarct miocardic), în boala canceroasă, după iradieri cu raze X sau după administrarea unor substanţe anticanceroase. În astfel de situaţii, în primul moment se produce în exces $O_2^-$ (anionul superoxid) care este rapid dismutat în $H_2O_2$ (peroxid de hidrogen). Dacă aceste specii de oxigen, care nu sunt foarte toxice, sunt influenţate de ionii metalici şi în special de $Fe^{2+}$, atunci se formează $OH^{\bullet}$ (radicalul hidroxil) sau specii foarte reactive de complexe oxigen + fier.



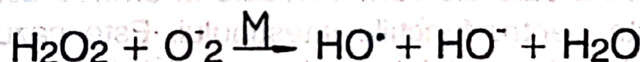
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + HO^-$$

sau



$$(RS)_2Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow (RS)_2Fe^{3+} + O_2^-$$

Se pare că cea mai mare reactivitate o are $OH^{\bullet}$ format sub acţiunea ionilor metalici (*M*).



$$H_2O_2 + O_2^- \xrightarrow{M} HO^{\bullet} + HO^- + H_2O$$

Epuratorii eficienţi ai $HO^{\bullet}$ ar fi DMSO (dimetil sulfoxid), DMTU (dimetiltiurea), DFX (desferioxiamina) care este un chelator al $Fe^{2+}$, BHT (butiratul de hidroxitoluen) etc.

În organism există unele limfokine care influenţează mobilitatea şi funcţiile fagocitare sau citotoxice ale PMN şi diverse enzime care inhibă producerea moleculelor toxice de oxigen. Este cazul glutation-peroxidazelor, SBTI (soybean trypsin inhibitor), TPCK (L-1-tosilamid, 2-fenil-etil-clorometil-cetona), $\alpha$1-antitripsinei etc. Toate acestea modulează funcţiile granulocitelor PMN, menţinându-le în limite fiziologice normale.

Deşi lipsite de specificitate funcţională, aceste celule pot influenţa răspunsul imun specific prin eliminarea antigenului şi, deci, anularea stimulului, prin blocarea complexelor antigen-anticorp etc. La om, neutrofilele din circulaţie sunt eterogene, exprimarea receptorilor *Fc* pe suprafaţa lor fiind diferită. Din acest punct de vedere ar exista cel puţin două subpopulaţii cu proprietăţi funcţionale distincte: unele formează rozete cu hematii care au legat specific pe suprafaţa lor anticorpi IgG, aderă mai bine la suprafeţe solide, fagocitează şi omoară mai intens bacteriile opsonizate (pe care s-au fixat specific anticorpii) şi sunt atrase chemotactic mai intens de componentele *C*5a ale complementului. Ele participă la formarea abceselor sau la reacţiile inflamatorii sterile, fiind primele care migrează în circulaţie; altele nu au aceste caractere, fiind o subpopulaţie care exprimă receptorul *Fc* mai slab şi care s-ar putea să fie formată din celule mai tinere.

## MASTOCITELE

Sunt celule care participă la o varietate de procese patologice, inclusiv la reacţiile alergice antiparazitare. Au fost descoperite de către EHRLICH în anul 1878, care le-a dat numele de mastocite, de la *mastung*, a îngrăşa. Această denumire a fost sugerată de faptul că ele sunt prezente din abundenţă în zona de ţesut conjunctiv, unde posibilităţile de nutriţie locală par a fi mai abundente. Se găsesc în leziunile de urticarie cutanată, în inflamaţiile cronice ale gingiilor, viscerelor etc. Hiperplazia lor este întâlnită în leziuni cu proliferare fibroasă, ca de pildă în filarioză, schistosomiază, sifilis, tuberculoză, miocardite reumatoide, artrite etc. Ulterior s-a demonstrat existenţa lor şi la nivelul ţesuturilor normale şi chiar în circulaţia sangvină. Tapiţează traiectele căilor respiratorii şi digestive şi se găsesc din abundenţă în piele, mai ales la nivel postcapilar, adică acolo unde au loc permeabilizarea vasculară, extravazarea macromoleculelor şi diapedeza leucocitelor.

În felul acesta mastocitele protejează organismul de agresiunea unor substanţe nocive, fiind la rândul lor stimulate de către acestea.

De asemenea, se găsesc din abundenţă în timus, în ţesutul limfoid, vezica urinară etc. În piele ar fi cca. 10 000 celule/$mm^3$ de ţesut. Cam acelaşi număr ar fi şi la nivelul tractusului digestiv, unde sunt prezente de la esofag până la colon, dar în special în lamina proprie a intestinului subţire. Numărul lor creşte mult în *boala Crohn* sau în infecţii intestinale, în special în cele cu nematode. Se pare că, la acest nivel, mastocitele şi filetele nervoase vegetative sunt intim asociate funcţional, motiv pentru care ele sunt implicate în diverse activităţi dintre care unele sunt relevante pentru funcţiile intestinului. Este cazul contractibilităţii muşchiului neted, stimulării acidului gastric, secreţiei de alcaline de către ileon, modificării fluxului ionic prin celulele epiteliului intestinal etc.

Precursorii lor derivă din măduva osoasă, migrând în torentul circulator şi apoi în ţesuturi, unde se diferenţiază în subpopulaţii eterogene, care din punct de vedere histologic ar aparţine la două grupe majore denumite la rozătoare *mastocite ale ţesutului conjunctiv* şi *mastocite ale mucoaselor,* iar la om, *mastocite triptozo-pozitive şi chimazo-negative* şi *mastocite triptozo-pozitive şi chimazo-pozitive,* notate $Mc^-$ respectiv $Mc^+$. Mastocitele ţesutului conjunctiv pot fi deosebite de cele ale mucoaselor nu numai prin localizarea lor, dar şi prin caracterele lor morfologice sau afinitatea tinctorială. Cele de tip "conjunctiv" sunt predominant prezente în piele, în muşchii gastrici, conţin multe granule cu mari cantităţi de histamină şi heparină, dar nu conţin aproape deloc leucotriene, fapt care sugerează rolul lor major în reacţiile de hipersensibilitate, dar minor în procesele inflamatorii. Cele de tip "mucoasă" conţin condroitin-sulfat E, cantităţi mici de histamină şi cantităţi mari de leucotriene. Nu conţin deloc heparină.

Şi la om cele două subpopulaţii diferă între ele prin conţinutul de proteaze neutre (tabelul 21). Celulele $Mc^-$ sunt localizate predominant la nivelul mucoaselor nazale, intestinale, iar cele $Mc^+$ la nivelul submucoaselor. De altfel, la fiecare dintre aceste nivele există un amestec al acestor două subpopulaţii, criteriul de clasificare al lor nefiind prea exact (tabelul 22).

*Tabelul 21*

**Conţinutul în proteaze neutre la mastocite şi bazofile**
**(după J. Miller şi L. Schwartz)**

| Proteaza | Caracterul fizico-chimic | Conţinutul în pg/celule | | |
|---|---|---|---|---|
| | | $Mc^-$ | $Mc^+$ | Bazofile |
| Triptaza | Tetramer de 134 kD conţinând Lys şi Arg* | 10 | 35 | 0,04 |
| Chimaza | Monomer de 30 kD conţinând Try şi Phe* | 0,04 | 4,5 | 0,04 |
| Carboxipeptidaza | Monomer de 34 kD conţinând Leu şi Ala* | - | 10 - 25 | - |

* Aminoacizii care conferă specificitate funcţională şi antigen.-ă moleculei.

*Notă.* Pentru identificarea celor două subpopulaţii umane de mastocite, se folosesc tehnici histochimice. Se realizează o dublă marcare a secţiunilor de ţesuturi, fixate cu Carnoy, cu un ser polivalent antichimază obţinut pe iepure şi un ser monovalent antitriptază obţinut pe şoarece. Celulele $Mc^-$ care conţin numai triptază se colorează în albastru iar cele $Mc^+$ care conţin triptază şi chimază se colorează în brun.

Originea subpopulaţiilor mature de mastocite nu este pe deplin cunoscută, în sensul că nu se ştie precis dacă derivă dintr-un precursor hematopoietic unic sau din diverşi precursori.

În cazul mastocitelor peritoneale de şoarece, se pare că există precursori diferiţi care, sub influenţa IL-3, generează celule de tip "mucoasă" cu o densitate celulară joasă, sau care, sub influenţa mediului de cultură îmbogăţit în interleukină-3 şi 4 (IL-3; IL-4), generează celule cu densitate mare, de tip "ţesut conjunctiv".

*Tabelul 22*

**Distribuirea mastocitelor $Mc^-$ şi $Mc^+$ în ţesuturile normale umane**
**(după J. Miller şi K. Schwartz)**

| Ţesutul sau organul | Poziţia | Procentul mastocitelor | |
|---|---|---|---|
| | | $Mc^-$ | $Mc^+$ |
| Piele | Derm | 12 | 18 |
| Pulmon | Subepiteliul bronşic | 77 | 23 |
| | Epiteliul bronşic | 95 | 5 |
| | Peretele alveolar | 93 | 7 |
| Intestin subţire | Mucoasă | 98 | 2 |
| | Submucoasă | 13 | 87 |
| Perete vascular | | 5 | 95 |

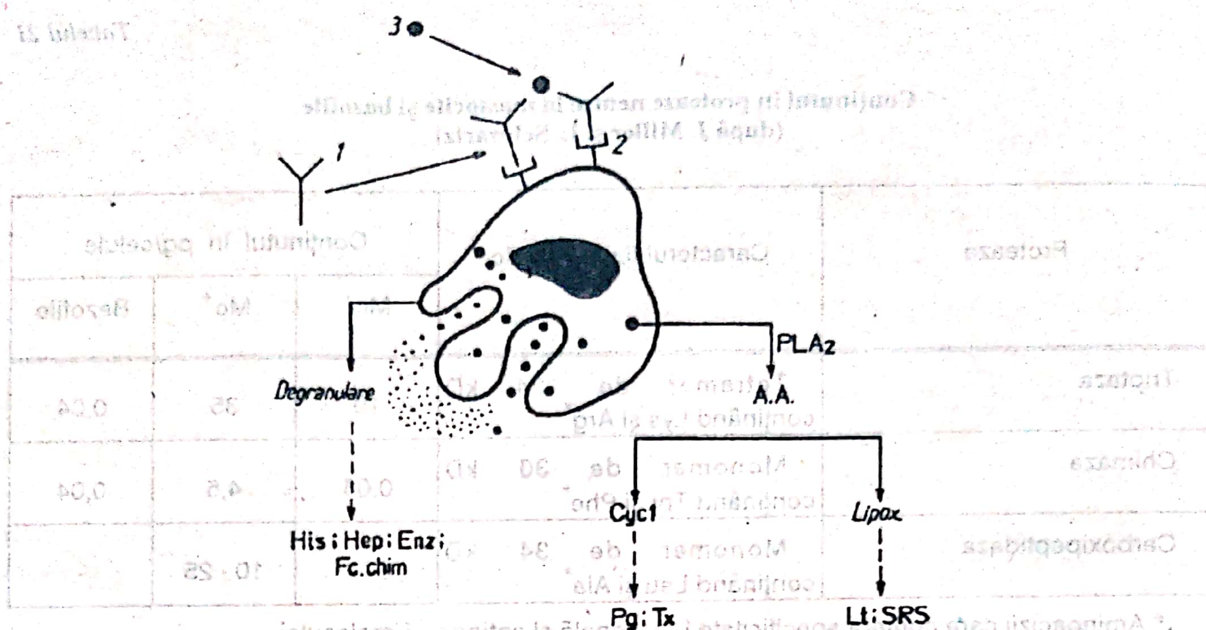



Fig.39. Eliberarea de mediatori chimici cu rol în declanşarea unor procese inflamatorii de către mastocite. Moleculele de IgE (1) se fixează la receptorul lor (2) de pe membrana mastocitelor. Alergenul (3) este recunoscut specific, legând încrucişat moleculele de IgE, proces în urma căruia sunt activate degranularea mastocitelor şi eliberarea de histamină (His), heparină (Hep), enzime (Enz) şi diverşi alţi factori chimici (Fc.chim). Totodată este activată fosfolipaza A2 (PLA2) care va stimula metabolismul acidului arahidonic (AA) şi producerea de prostaglandine (PG) sau tromboxani (Tx) pe cale ciclooxigenazică (Cycl), sau de leucotriene (LT) sau "substanţe de reacţie lentă" (SRS) pe cale lipooxigenazică (Lipox).

Capacitatea de proliferare şi sinteză de mediatori solubili a acestor celule depinde în mare măsură nu numai de precursorii lor; ea este mult influenţată şi de unii factori din mediul înconjurător unde are loc maturarea, factori ce ar genera semnale capabile să influenţeze potenţialul de sinteză al celulelor, orientându-le spre o direcţie sau alta. La om, de exemplu, se pare că ar fi totuşi linii distincte $Mc^-$ şi $Mc^+$, proliferarea celor $Mc^+$ având loc înaintea celor $Mc^-$.

La pacienţii cu SIDA există o scădere selectivă a populaţiei $Mc^-$ de la nivelul mucoasei şi submucoasei intestinului, fără o modificare semnificativă a populaţiei $Mc^+$.

Celulele mature sunt mononucleare, ovoide sau alungite, cu granule cu diametrul de 0,2-0,4 $\mu$m, care maschează nucleul, cu un reticul endoplasmatic rugos, cu numeroase mitocondrii, filamente submembranare şi granule metacromatice dense. Granulele sunt dispuse sub formă de "sul", de "fişic" sau, în unele stări de activare a celulelor, sub formă de "grilaj". Morfologia lor ar corela cu compoziţia în proteaze neutre; la unele $Mc^+$ ambele proteaze sunt în aceeaşi granulă iar granulele sunt mai mari, cu forme mai puţin variabile şi cu o dispunere sub formă de "grilaj". Pe baza caracteristicilor ultrastructurale se pot deosebi celulele $Mc^-$ de cele $Mc^+$, fapt care demonstrează că exprimarea acestor caracteristici nu este influenţată de factorii locali ci este în mare măsură rezultatul provenirii lor din precursori diferiţi. Fiecare celulă are cca. 100 000 - 500 000 de receptori de membrană pentru moleculele IgE, pentru IgG, unele componente ale complementului ca de pildă *C*3a, *C*5a etc. Mastocitele de şoarece au şi receptori pentru subclasele IgG1, IgG2a, IgG2b iar cele de şobolan, receptori pentru componenta *C*3b a complementului.

Receptorii pentru IgE sunt de natură glicoproteică, cu greutatea moleculară de 55-60 kD. Prin intermediul lor, celulele pot fi stimulate şi activate de către IgE, fragmentele *C*3a şi *C*5a ale complementului etc.

Deşi sunt capabile de mişcări ameboidale şi de fagocitoză, atributul lor funcţional major este acela de eliberare de mediatori chimici, cu rol în declanşarea unor procese inflamatorii, sau a unor reacţii de hipersensibilitate (fig. 39). Graţie acestor proprietăţi funcţionale, ele sunt primele celule care stimulează afluxul granulocitelor PMN şi al monocitelor la locul inflamaţiei. Stimulate prin ionoforul A 23187 sau IgE, mastocitele eliberează activ o serie de mediatori solubili preformaţi sau formaţi ca urmare a stimulului survenit (tabelul 23).

Unele peptide, ca de pildă peptida intestinală vasoactivă (VIP), bradichinina, neurotensina sau somatostatina, provoacă eliberarea de histamină de către mastocitele conjunctive, pe când altele, cum ar fi substanţa P, activează funcţiile secretorii atât ale mastocitelor conjunctive, cât şi ale celor de "tip mucos". Componentele majore proteice ale granulelor secretorii ale mastocitelor sunt proteazele neutre dintre care două, după cum am mai menţionat, permit identificarea a două tipuri diferite de mastocite umane. Este cazul *triptazei* şi *chemazei*.

Şi alte proteaze pot servi ca markeri pentru mastocite. Este cazul carboxipeptidazei, elastazei, catepsinei G etc.

O componentă majoră a granulelor secretorii ale acestor celule o reprezintă peptidoglicanii, nişte lanţuri laterale de glicozamine, glicani cu sarcină electrică negativă, legaţi la o proteină monomer CORE, responsabili de coloraţia metacromatică a moleculelor. Produşii de metabolism ai acidului arahidonic sunt vasoactivi şi spasmogeni, cu activitate chemotactică. Provin atât din "linia" lipo-oxigenazică, având ca reprezentanţi majori leucotrienele, cât şi din cea ciclo-oxigenazică, de genul prostaglandinelor (PG) şi tromboxanilor (Tx).

*Tabelul 23*

**Formarea mediatorilor mastocitelor în raport cu momentul stimulului celulei**

| Momentul formării | Mediatorii |
|---|---|
| Preformaţi (prezenţi în granulele secretorii înainte de stimul) | Histamina (1 - 2 pg/celulă)<br>Superoxiddismutaza (SOD)<br>Factorii chemotactici neutrofili (NCF)<br>Proteoglicanii<br>Factorii chemotactici eozinofili ai anafilaxiei (ECF - A)<br>Enzime lizozomale<br>Peroxidaze<br>Heparina<br>Chemotripsina<br>Serotonina |
| Nou formaţi (consecutiv activării mastocitelor) | Prostaglandina ($PGD_2$)<br>Tromboxan (Tx)<br>Leucotriene (LT)<br>Factorul de activare a trombocitelor (PAF) |

De asemenea un produs major de secreţie este histamina, prezentă atât în granulele mastocitelor cât şi în cele ale bazofilelor. Unii dintre mediatorii mastocitelor sunt preformaţi, în timp ce alţii sunt sintetizaţi ca urmare a stimulului declanşator.



6 - Imunologie - cd 114

Interacţia antigenului cu anticorpii din clasa IgE fixaţi specific sau citofilic la celulă, respectiv prin *Fab* sau *Fc*, iniţiază degranularea acestora, un proces biologic rapid, dependent de temperatură şi de prezenţa $Ca^{2+}$. Reacţia este însoţită de scăderea cAMP de la nivel celular. După fixarea antigenului la IgE, se transmite un mesaj intracitoplasmatic care inhibă activitatea adenilciclazei, o enzimă care transformă adenozintrifosfatul (ATP) în 3'-5'-adenozinmonofosfat ciclic. Scăderea cAMP este contrabalansată de activarea guanilciclazei şi creşterea pragului de guanidin-monofosfat ciclic (cGMP) asociată cu transportul granulelor către peretele celular şi eliberarea extracelulară a diverşilor mediatori cantonaţi în acestea.

Practic, "degranularea anafilactică" s-ar realiza în secvenţe multiple care ar dura între 1 minut şi 48 de ore. Iniţial, granulele mastocitelor se "umflă" şi încep să comunice între ele prin fuziunea membranelor. Se formează "canale de degranulare" care conţin matricea granulară modificată şi care se deschid prin "pori" în membrana plasmatică. Prin aceste canale este eliberat conţinutul proteic şi lipidic al granulelor, tot procesul durând cca. 20 de minute, timp în care are loc şi eliberarea histaminei la intensitate maximă. Multe canale de degranulare, prin exteriorizarea lor, provoacă o alungire a suprafeţei celulare care, la examenul microscopic, apare sub formă de pliuri. Alte canale, care nu s-au alungit şi nu au format pliuri, nu au deschidere la membrana celulară. Ulterior, sunt activate mecanismele de sinteză celulară, cu referire specială la aparatul Golgi şi ribozomi, timp în care se înregistrează mărirea volumului nucleului şi formarea de noi granule.

Toate aceste procese sunt însoţite de creşterea volumului celulei şi de modificări în morfologia ei.

În afară de IgE, principalul anticorp sensibilizant, mastocitele mai pot fi degranulate de către IgG4 sau chiar de către dextran, concanavalină A (Con A), hormonj adrenocorticoizi (ACTH), vitamina A, diverşi polimeri etc. Timpul de activare necesar pentru declanşarea degranulării este condiţionat de natura stimulului primit de către celulă. Activarea prin antigen declanşează un răspuns rapid, pe când semnalele primite de la anafilatoxine sau de la factori secretaţi de către limfocitele *T* necesită un timp mai lung până la eliberarea mediatorilor preformaţi sau nou sintetizaţi.

În afară de procesele inflamatorii şi alergice, se pare că aceste celule intervin şi în apărarea antitumorală, fiind capabile să ucidă unele celule tumorale, probabil prin sinteza şi eliberarea masivă de serotonină. Bazofilele şi mastocitele sunt similare din multe puncte de vedere, ambele posedând granule metacromatice şi receptori de mare afinitate pentru IgE. Se credea, până nu de mult, că o deosebire esenţială între mastocite şi bazofile este aceea că primele nu se găsesc în circulaţie ci numai în ţesuturi. Ulterior, s-a dovedit că şi mastocitele sunt celule circulante, care nu conţin "proteina de bază majoră" (MDP) sau lizofosfolipaza, deosebindu-se din acest punct de vedere de bazofile.

Multe dintre substanţele eliberate de mastocite pot afecta ţesutul conjunctiv ducând la fibroză şi alterări tisulare profunde. De exemplu, histamina stimulează proliferarea fibroblastelor şi sinteza colagenului, heparina exercită o importantă activitate chemotactică pentru celulele de la nivelul endoteliului capilar, proteoglicanii au rol în vindecarea rănilor cutanate etc.






# CELULELE PREZENTATOARE DE ANTIGEN (APC) DIN SERIA MIELOIDĂ

Sunt "celule accesorii" ale răspunsului imun, tipul reprezentativ cel mai bine cunoscut fiind cele din seria monocitar-macrofagică, înzestrate cu funcţii fagocitare (tabelul 24).

*Tabelul 24*

**Unele caracteristici ale celulelor prezentatoare de antigen derivate din seria mieloidă**

| Caracteristici | Celulele | | |
|---|---|---|---|
| | Dendritice | Langerhans | Monocite/macrofage |
| Organul | Ganglioni<br>Timus<br>Ţesuturi<br>Sânge (?) | Epiderm | Sânge (monocite)<br>Suprafaţa mucoaselor<br>Ţesuturi |
| Aderenţa la suprafeţe | + | + | + |
| Capacitatea de a reţine şi prezenta antigenul | + | + | + |
| Funcţii fagocitare | - | - | + |
| Granule Birbeck | - | + | - |
| Receptori *Fc* (*Fc*R) | - | + | + |
| Receptori pentru complement | - | + | + |

De fapt, celulele care prezintă antigenul limfocitelor *T* aparţin la diferite populaţii, dintre care cele mai active sunt celulele dendritice, macrofagele şi limfocitele *B*. Macrofagele fagocitează antigenul şi îl prelucrează înainte de a-l prezenta limfocitelor, pe când celulele dendritice şi limfocitele *B* nu-l internalizează sau nu-l prelucrează, fixând, prin intermediul receptorilor de membrană, macromoleculele solubile, străine de organism, care vor fi apoi recunoscute de către limfocitele *T*. Toate aceste celule alcătuiesc, sub raport funcţional, grupa celulelor "prezentatoare de antigen", sau APC ("antigen presenting cells").

## CELULELE DENDRITICE

Existenţa lor a fost descoperită în anul 1973 când au fost considerate ca "un nou tip de celule în organele limfoide periferice ale şoarecelui". Ulterior, s-a stabilit că sunt prezente şi în afara organelor limfoide, fiind larg răspândite în tot organismul şi înzestrate cu un important rol potenţial în inducerea răspunsului imun. În ţesuturi se găsesc în proporţie mai mică de 1% din totalul leucocitelor, se deosebesc morfologic şi antigenic de monocite şi limfocite, caracteristica lor funcţională majoră fiind capacitatea de stimulare a limfocitelor *T*, cu rol reglator în

reacţiile mixte leucocitare. Izolarea din organele limfoide şi din sânge se bazează pe o proprietate particulară a acestor celule: aderă la suprafeţe imediat după izolare, pentru ca să devină neaderente după 24 de ore de cultivare *in vitro* (probabil ca urmare a modificării numărului sau structurii moleculelor de adeziune de la nivelul membranei plasmatice).

În general, izolarea este dificilă, suspensiile celulare conţinând şi macrofage, motiv pentru care se recurge la numeroase metode şi tehnici care ţin cont de proprietăţile şi caracteristicile acestor celule: a) centrifugare în gradient de serumalbumină bovină; b) aderenţă selectivă la suprafeţe; c) iradierea suspensiilor pentru uciderea celulelor sensibile (celulele dendritice sunt radiorezistente); d) citotoxicitate complement-dependentă cu utilizare de anticorpi monoclonali care recunosc determinanţii antigenici specifici macrofagelor, celulelor *NK* etc.

Au o formă neregulată, cu proeminenţe ascuţite ca nişte spini sau sub formă "bulbară" , de lamele etc., din cauza formei lor particulare fiind denumite "celule interdigitale". Nucleul este oval sau de formă neregulată, citoplasma conţine numeroase mitocondrii dense, care se deosebesc de cele filamentoase ale macrofagelor. Au puţini poliribozomi, sunt sărace în reticul endoplasmatic rugos dar bogate în reticul neted.

Nu fagocitează şi au activitate slabă pinocitară, adică nu internalizează particulele solide şi introduc puţine molecule solubile intracelular, motiv pentru care sunt sărace în vezicule endocitare şi lizozomi. Se pare totuşi că *in vivo,* celulele interdigitale au funcţii fagocitare. Se găsesc în ariile *T*-dependente ale organelor limfoide şi în alte organe, ca de pildă rinichi, ficat, inimă, pancreas, tiroidă, unde au forme diferite şi exprimă funcţii diferite (tabelul 25).

Celulele Langerhans din piele, care derivă probabil din monocite deoarece exprimă receptori pentru complement şi *Fc,* pot să se diferenţieze *in vitro* în celule dendritice, de unde speculaţia teoretică a originii acestora din seria mieloidă. Citoplasma este bogată în granule Birbeck. Totuşi, nu au markerii antigenici specifici monocitelor-macrofagelor, deşi exprimă pe suprafaţa membranei antigene MHC de clasa I şi în special de clasa II şi HLA-DP şi HLA-DQ. Mai mult, celulele Langerhans pot prelucra şi prezenta antigenul limfocitelor *T*, iniţiind răspuns imun specific cu rol major în protecţia faţă de unele parazitoze cutanate, ca de pildă leishmanioza, pe când celulele dendritice ar prelucra eventual foarte slab antigenul, lipsa enzimelor lizozomale fiind suplinită de unele enzime peptidazice de la nivelul membranei (conţin fosfataze acide, peroxidaze, esteraze, ATP-aze legate la membrană). Se deosebesc de macrofage şi prin capacitatea redusă sau chiar nulă de sinteză a unor citokine. Ar produce doar IL-1 şi IL-6, deşi această funcţie încă nu este bine precizată deoarece sunt lipsite de mARN. Caracteristica majoră a acestor celule este potenţialul lor de ataşare la limfocitele *T*.

Exprimarea masivă a antigenelor MHC de clasa I şi II, sărace în acid sialic, şi a moleculelor de adeziune ar asigura un mare potenţial de reţinere a limfocitelor *T* şi de prezentare a antigenului în asociere cu moleculele MHC, într-o manieră amplificată.

Dificultăţile în separarea şi obţinerea unei populaţii purificate de celule dendritice sunt cauza multor lacune în cunoaşterea aprofundată a biologiei lor, dar este cert că ele au rol important în prezentarea antigenului şi în cooperările celulare necesare generării răspunsului imun specific.

Tabelul 25

**Tipuri de celule dendritice cu caracteristici, localizări şi funcţii diferite (după Ph. King şi D. Katz)**

| Tipul celulei | Localizare | Rolul funcţional major |
|---|---|---|
| Celula dendritică timică | Medulara timusului | Inducerea toleranţei |
| Celula dendritică interdigitală | - Paracortexul ganglionilor limfatici<br>- Foiţa limfatică periarteriolară splenică<br>- Plăcile Peyer<br>- Medulara timusului | Prezentarea antigenelor limfocitelor T |
| Celula dendritică interstiţială | - În parenchimul organelor (ţesut conjunctiv interstiţial) cu excepţia creierului | - Captarea şi prelucrarea antigelului |
| Celule dendritice foliculare | - În centrii germinativi (ariile B dependente din splină şi ganglioni)<br>- În plăcile Peyer | - Reglarea memoriei limfocitelor B |
| Celule Langerhans | - Epiderm | - Captarea şi prelucrarea antigenului<br>- Rol important în protecţia faţă de unele parazitoze cutanate *(Leishmania)* |
| Celula cu "văl" | - În limfaticele aferente ale ganglionilor<br>- În ductul limfatic toracic | - Transferul de antigene |
| Celula dendritică din sângele periferic | Sânge periferic | - Forma migratoare a celulelor dendritice |

## FAGOCITELE MONONUCLEARE (MONOCITELE ŞI MACROFAGELE)

Sunt celule larg răspândite în organism, care formează "sistemul fagocitelor mononucleare" derivat din seria mieloidă.

Au fost descoperite de către METCHNICOV (1883), care le-a dat denumirea de macrofage datorită vitezei cu care pot fagocita particulele străine. Derivă din "promonociţi", precursori medulari care pătrund în curentul sangvin în absenţa stimulilor inflamatori, transformându-se în "monocite" care rămân în circulaţie un număr limitat de ore (la şoarece cca. 22 de ore) după care ajung în ţesuturi unde se diferenţiază în macrofage rezidente cu morfologie caracteristică şi chiar cu markeri antigenici caracteristici. Deci, monocitele nu constituie o subpopulaţie

distinctă de macrofage, ci forma lor circulatorie aflată într-un stadiu timpuriu de dezvoltare. În linii mari, evoluţia lor este următoarea:

a) la nivelul măduvei osoase sunt: celula matcă → hemocitoblast → monoblast → promonocit →

b) în circulaţia sangvină → monocit →

c) în ţesuturi → celule mature, cu diferite denumiri.

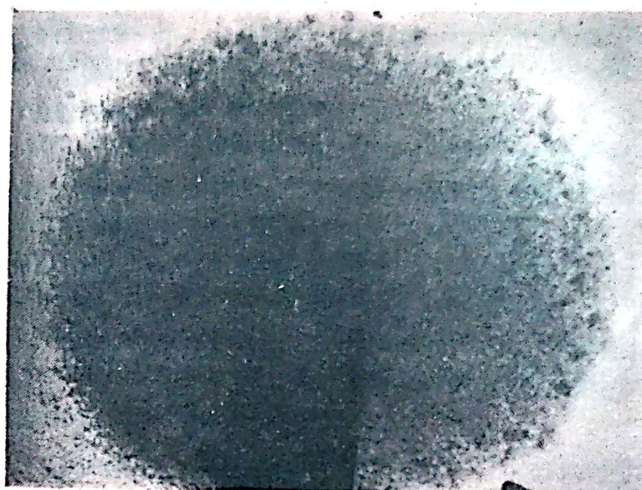


Fig.40. Aspectul ariei de migrare a macrofagelor *in vitro*. Macrofagele incubate *in vitro*, într-un tub capilar plasat într-o placă Petri cu mediu de cultură pentru limfocite, părăsesc capilarul răspândindu-se în jurul orificiului de ieşire de la extremitatea acestuia. Suprafaţa pe care se răspândesc este vizibilă cu ochiul liber, având forma unei coroane de pom.

Pătrunderea macrofagelor în ţesuturi este precis controlată de către receptorii de adeziune, care interacţionează cu liganzi caracteristici locului respectiv. Ele formează populaţia "fixă", capabilă totuşi de mobilitate, care *in vitro* se poate vedea cu ochiul liber (fig. 40), populaţie care poartă denumiri diferite condiţionate de locul în care se găsesc (tabelul 26).

*Tabelul 26*

**Denumirea fagocitelor mononucleare în relaţie cu locul lor de cantonare în organism**

| Denumirea celulelor | Organul sau ţesutul unde s-au fixat |
|---|---|
| Monocite | În sânge |
| Macrofage peritoneale | La nivelul peritoneului |
| Macrofage alveolare | La nivelul alveolelor pulmonare |
| Celule Kupffer | În ficat |
| Celule microgliale | În creier |
| Osteoclaste | În ţesutul osos |
| Celule Langerhans * | În piele |

*A nu se confunda cu insulele Langerhans din pancreas.

Unele dintre ele sunt mai aderente la suprafaţa sinusurilor sau interstiţiilor, cum ar fi microgliile din sistemul nervos, celulele Kupffer din ficat, celulele Langerhans din epitelii, pe când altele sunt slab aderente. Este cazul celor peritoneale sau alveolare care au o morfologie diferită (rotunde) şi care pot fi îndepărtate prin lavajul suprafeţei cu lichide reci.

Macrofagele sunt extrem de eterogene din punct de vedere morfologic. De exemplu, monocitele, cele mai bine studiate datorită uşurinţei cu care pot fi recoltate şi separate de restul celulelor, au un diametru de 10-18 $\mu$m, deci sunt ceva mai mari decât limfocitele şi au un nucleu caracteristic, în formă de potcoavă.

Celulele fixe pot varia ca dimensiuni de la 50 la 200 $\mu$m. Ca şi monocitele, ele au o citoplasmă relativ abundentă, bogată în lizozomi de forma unor granule mari, care conţin peroxizi şi hidrolaze acide cu rol major în uciderea intracelulară a microorganismelor. Nucleul poate avea formă rotundă, ovală, reniformă sau de potcoavă, dispus central. În cazul fagocitării unor materiale voluminoase, el poate fi deplasat spre periferia celulei. Marginile celulei sunt "dantelate" cu microvili proeminenţi, cu numeroase prelungiri, uneori extrem de fine şi lungi, care tind să ajungă la particulele fagocitabile. *In vitro*, aderă la suprafeţe de sticlă sau plastic, aspectul lor fiind condiţionat de intensitatea aderării, de gradul lor de activare, de condiţiile de cultivare etc. De exemplu, celulele care se găsesc într-o condiţie fiziologică bună aderă la suport, devenind extrem de polimorfe; au aspect stelat, de fus, de suveică, suliţă etc. (fig. 41).

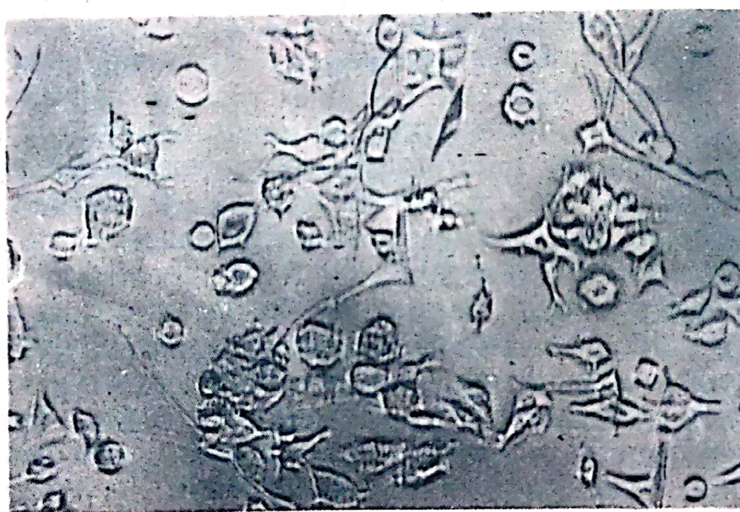


Fig.41. Aspectul macrofagelor cultivate *in vitro*. În condiţii de cultivare optime, celulele aderă la suprafaţa vaselor de cultură, luând formele cele mai bizare: de fus, rachetă, suveică etc.

Când îmbătrânesc sau trăiesc în condiţii improprii, celulele se rotunjesc, se desprind de suport, se vacuolizează şi mor. Durata lor de viaţă este relativ scurtă (cca. 75 de zile), zilnic fiind înlocuite cca. $7 \times 10^6$ celule/kg/oră.

Progenitoarele, derivate din seria mieloidă care formează sistemul fagocitar mononuclear, execută două funcţii importante, efectuate de către două tipuri diferite de celule: unele sunt de profesie "fagocitare" cu rol în eliminarea particulelor de antigen, iar altele sunt "prezentatoare de antigen" limfocitelor cu receptori specifici, de unde şi denumirea lor de "celule APC".

O delimitare categorică între aceste două populaţii funcţionale este greu de făcut. În orice caz, celulele fagocitare pot fi activate de factori eliberaţi de limfocitele *T* şi pot produce diferiţi mediatori solubili, iar cele APC pot prezenta antigenul limfocitelor într-o manieră adecvată funcţional.

Prototipul APC este celula Langerhans din piele, cu o formă caracteristică de "rachetă de tenis" şi granule Birbeck. Celulele Langerhans migrează în

paracortexul ganglionilor unde prezintă celulelor *T* antigenele aduse de la nivelul pielii. Sunt bogate în antigene de clasa II MHC.

În foliculii secundari ai ariilor *B*-dependente din splină şi ganglionii limfatici, se găsesc celulele dendritice cu rol de APC. Aşa se explică de ce inocularea intradermică a unui antigen este urmată predominant de activarea limfocitelor *T* şi răspuns imun imediat celular, iar inocularea i.v. sau s.c., de sinteză de anticorpi. Celulele APC au fost găsite şi în medulara timusului. La acest nivel, ele sunt bogate în antigene MHC de clasa II, de unde concluzia că rolul lor ar fi acela de a informa precursoarele *T* despre natura antigenelor, proprii organismului respectiv.

Tot macrofagele rezidente în ţesuturile normale participă alături de granulocite la "prima linie de apărare" a organismului contra infecţiilor şi diferitelor injurii, deplasându-se la locul afectat ca urmare a semnalelor chemotactice primite, dintre care majoritatea includ produse macrofage sau ale limfocitelor *T*. Cele nou sosite la locul agresiunii diferă funcţional de macrofagele rezidente. Ele sunt mai puţin mature, capabile de "oxidări respiratorii" şi de eliberarea unui mare număr de produse secretorii implicate în amplificarea proceselor inflamatorii sau în alte procese biologice. Sunt fie macrofage "activate imunologic" consecutiv contactului cu germeni intracelulari ca de pildă BCG, fie "impulsionate" prin stimuli proveniţi de la bacterii Gram-negative, cum ar fi LPS.

Din punct de vedere funcţional, celulele sistemului fagocitar au următoarele atribute majore: a)funcţii fagocitare sau antixenice; b) activităţi de sinteză şi secreţie; c) activităţi citotoxic-citostatice şi d) funcţii reglatoare.

**Funcţiile antixenice ale macrofagelor** sunt cruciale pentru apărarea organismului împotriva unui mare număr de agresori. Ele exprimă un proces înalt selectiv, dar nespecific, care controlează interacţiunea dintre membrana celulară şi suprafaţa particulei care urmează a fi înglobată, cele mai mici de 0,1 $\mu$m fiind "pinocitate", iar cele mai mari, "fagocitate". Celula fagocitară poate face discriminarea între o particulă "ingerabilă" şi una "neingerabilă", chiar dacă acestea sunt foarte aproape una de alta pe suprafaţa membranei. Aceste interacţiuni sunt necesare atât pentru iniţierea fagocitozei, cât şi pentru definitivarea ei, deci pentru emiterea de pseudopode şi pentru programarea lor în vederea completei "învăluiri" a materialului ce urmează a fi înglobat.

Ulterior vor fi generate semnale care vor controla ingestia, digestia şi asocierea componentelor imunogene ale antigenului cu componentele membranei celulei accesorii (fig. 42). Pe lângă acest mod de fagocitoză, există şi o fagocitoză "imună" sau "opsonică", realizabilă atunci când antigenul este recunoscut şi fixat de către

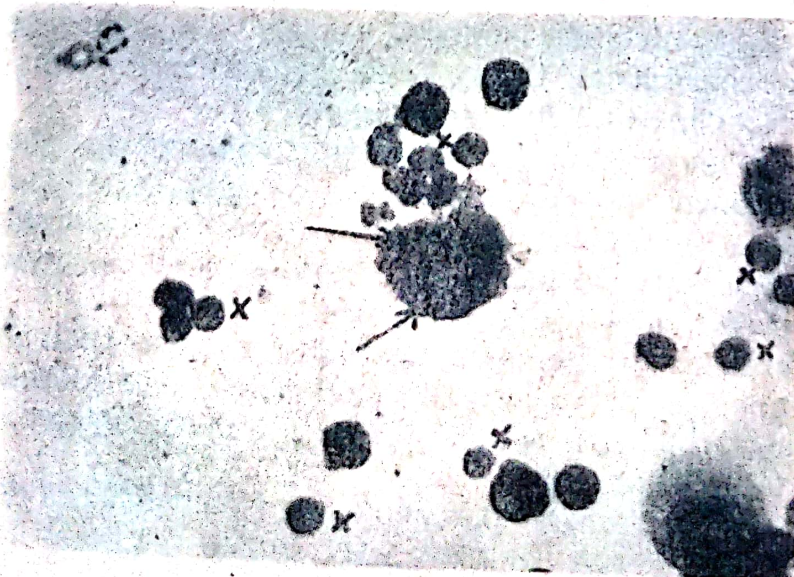


Fig.42. Monocit din sângele periferic uman, menţinut *in vitro* în mediu de cultură în care au fost suspensionate hematii de oaie (X). După 30 de minute, se observă existenţa intracitoplasmatică a două hematii fagocitate (săgeţile).

anticorpi, complex care poate sau nu poate fixa complementul. Molecula de anticorp se va fixa la receptorul pentru *Fc* de pe membrană prin fragmentul său *Fc*, sau complementul se va fixa la receptorul pentru complement şi, prin intermediul acestora, antigenul va fi înglobat în celula fagocitară (fig. 43).

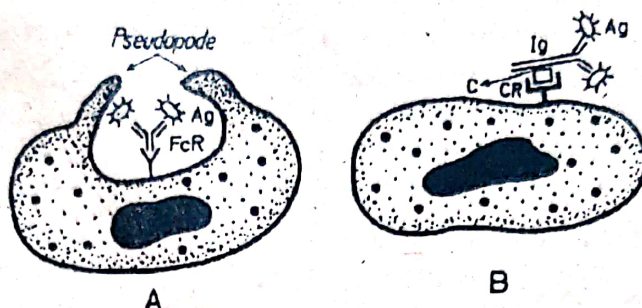



Fig.43. Fagocitoza "imună" sau "opsonică". A. Antigenul (Ag) este recunoscut specific de către moleculele de anticorp. Complexul antigen-anticorp format se fixează la receptorii de pe membrana macrofagelor (FcR), celulele emit pseudopode şi înglobează intracitoplasmatic antigenul astfel fixat. B. Antigenul (Ag) este recunoscut de către anticorp (Ig) formând complexul antigen-anticorp care poate lega componente ale complementului (C). Receptorii pentru complement (CR) de pe membrana celulară fixează aceste componente reţinând întregul complex.

În linii mari, secvenţele procesului fagocitar sunt următoarele: ataşarea antigenului la suprafaţa membranei celulare, urmată de generarea unor semnale care vor controla emiterea de pseudopode şi formarea fagozomilor. Odată formaţi, fagozomii fuzionează cu lizozomii care furnizează enzimele necesare degradării materialului ingerat, degradare care are loc în fago-lizozom.

Spre deosebire de granulocitele PMN, macrofagul este mai sărac în enzime lizozomale, putând degrada antigenul parţial, cu menajarea epitopilor. După digestie, epitopii sunt proiectaţi pe suprafaţa membranei şi prezentaţi limfocitelor care-i vor recunoaşte specific. Experimental, este dovedit faptul că antigenul prelucrat de APC este mai imunogen în comparaţie cu cel neprelucrat. Mai mult, s-a constatat că antigenele slabe, după ce au fost fagocitate, devin antigene puternice dar, pentru aceasta, este necesar să fie prezentate limfocitelor numai de către macrofagele vii. Într-adevăr, dacă unor animale li se inoculează acelaşi antigen, fie singur, ca atare, fie după ce a fost fagocitat, răspunsul imun cel mai intens se înregistrează la animalele care au primit antigenul fagocitat, deci antigenul şi macrofagele vii. Dacă macrofagele, care au fagocitat antigenul, înainte de inoculare sunt omorâte, răspunsul imun al animalelor astfel stimulate nu mai este la nivelul celui înregistrat cu macrofage vii. La imunizaţi, macrofagele primesc un semnal activator eliberat de către limfocitele *T* (MAF = macrofage activating factor, sau factorul de activare al macrofagelor) care le activează funcţiile. Aceste macrofage activate sunt mai mari în volum, au marginile mai sinuoase şi mai dantelate, aderă mai puternic la suprafeţe, au o activitate crescută a enzimelor lizozomale, un conţinut mare de adenilciclază, o activitate bactericidă mare, activitate fagocitară intensă etc. Datorită exacerbării funcţiilor lor, mai sunt denumite şi *macrofage furioase*.

Activarea macrofagelor poate fi expresia unui proces nespecific generat de unul specific (influenţa exercitată asupra lor de către limfocitele *T* stimulate de antigen), sau tot nespecific, cum este cazul celor activate, nu de către MAF, ci de o varietate de substanţe de genul endotoxinelor bacteriene, ARN, diverşi adjuvanţi etc. Macrofagele activate eliberează masiv $O_2^-$, $H_2O_2$, au activitate bactericidă

sporită, produc factori solubili cu funcţiii citotoxice pentru o gamă largă de celule tumorale etc. Ele pot înconjura unele focare infecţioase şi să formeze granuloame atunci când nu pot ucide bacteriile, izolându-le în felul acesta de restul ţesuturilor organismului. În cazul în care la receptorii *Fc* de pe membrana lor se fixează molecule de anticorp, macrofagele devin *armate,* capabile deci să fixeze mult mai rapid şi specific antigenele, fenomen de o importanţă semnificativă în special în apărarea antitumorală. Exprimarea pe membrana macrofagelor a unor receptori, ca de pildă receptorul pentru componenta *C* 3a a complementului, receptorul *Fc* sau MFR (receptorul pentru manosyl-fucosyl), permite aderarea lor, fagocitarea şi, implicit, activarea funcţională. De asemenea, unele citokine, ca de pildă cele secretate de către limfocitele *T* şi în special IFN - $\gamma$ reglează creşterea, diferenţierea, mobilizarea şi modularea unor funcţii ale acestei populaţii de celule (tabelul 27).

*Tabelul 27*

**Unele caracteristici şi funcţii ale macrofagelor rezidente în diferite ţesuturi**

| Organul sau ţesutul | Caracterul şi funcţiile macrofagelor |
|---|---|
| Măduva osoasă şi ficatul fetal | - O reţea de macrofage mature, cu receptori de adeziune pentru celulele hematopoietice (mieloide, eritroide). Acestea se leagă la membrana macrofagelor, fără a fi fagocitate<br>- Nu produc molecule active de oxigen |
| Splină | - Eterogene fenotipic<br>- Situate în pulpa roşie şi în zona marginală a pulpei albe<br>- Funcţii fagocitare<br>- Interacţionează cu limfocitele *T* şi *B* |
| Ficat şi intestin | - Celulele Kupffer sunt relativ omogene, exprimă receptori *Fc* şi MFR (receptori pentru manosyl-fucosyl). Interacţionează cu hepatocitele<br>- Sunt activate de BCG dar eliberează deficitar $O_2$ sub influenţa IFN - $\gamma$<br>- Rezidente în lamina propria |
| Pulmon | - O populaţie care tapisează suprafaţa alveolelor, dar care aderă slab la această suprafaţă. Implicate în apărarea locală<br>- Sunt capabile de autoreplicare (proliferează *in vitro* ca răspuns la CSF)<br>- Permeabilizează vascularizaţia, favorizând pătrunderea şi recrutarea monocitelor<br>- Contribuie la procesul de fibrozare în caz de silicoze |
| Piele | - Celule Langerhans. Variază în relaţie cu exprimarea markerilor caracteristici macrofagelor |
| Sistemul nervos | - Celule foarte arborizate (microglii) lipsite de multe dintre caracterele macrofagelor din alte ţesuturi<br>- Traversează bariera hematoencefalică în urma morţii naturale a neuronilor<br>- Microgliile din interiorul creierului exprimă puţin *CD* 4. Cele din afara barierei hematoencefalice exprimă intens acest marker |

Intensitatea şi durata degradării antigenului ingerat este condiţionată de către caracterele fizico-chimice ale acestuia. De exemplu, albumina serică este descompusă foarte rapid, pe când polizaharizii pneumococici sau polipeptidele sintetice sunt degradate lent. De asemenea, este cunoscut faptul că unele bacterii, cum ar fi mycobacteriile, pot persista foarte multă vreme în interiorul macrofagului fără a fi degradate.

**Funcţiile secretorii ale macrofagelor.** Este bine dovedit faptul că fagocitele mononucleare eliberează în mediul înconjurător substanţe cu greutate moleculară diferită, care joacă un rol important în mecanismele de apărare ale gazdei (tabelul 28). O parte dintre acestea au fost identificate ca entităţi chimice, în timp ce existenţa altora a fost intuită mai mult pe baza efectelor exercitate asupra altor celule sau bacterii. Unele dintre ele sunt într-adevăr secretate ca urmare a unei sinteze active, pe când altele sunt doar "desprinse" de la locul de sechestrare intracelulară în momentul în care celulele primesc anumiţi stimuli din exterior. Intensitatea, natura şi durata stimulilor externi influenţează funcţiile secretorii ale acestor celule. În linii generale, macrofagele, fie că este vorba de forma lor circulantă (monocite), fie de cea a diferitelor tipuri de celule fixe, secretă enzime hidrolitice, unii derivaţi ai acidului arahidonic, diverse componente ale complementului sau alte produse cu efecte directe sau indirecte asupra unor funcţii celulare (tabelul 29).

*Tabelul 28*

**Produse secretate de către macrofage după D. Rappolee şi Z. Werb)**

| |
|---|
| *Hormoni polipeptidici* |
| Interleukina-1 $\alpha$ şi interleukina-1$\beta$ |
| Somatotropina |
| TNF-$\alpha$ (caşectina) |
| Interferon-$\alpha$ |
| Interleukina-6 |
| PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) |
| Substanţa P |
| FGF (fibroblast Growth Factor) |
| FAF (fibroblast Activating Factor) |
| TGF$\alpha$ (Transforming Growth Factor) |
| TGF$\beta$ (Transforming Growth Factor-$\beta$) |
| Thymosina B4 |
| EPO (eritropoietina) |
| G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) |
| GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Stimulating Factor) |
| EPA (Erythroid Colony -Potentiating factor) |
| FIM (Factor-Inducing Monocytopoiesis) |
| $\beta$- endorphina |
| ACTH-(Adrenocorticotrophic Hormon) |
| PGF (Plasmacytoma Growth Factor) |
| Neutrophil-activating factor |
| *Componente ale complementului* |
| Calea clasică: C 1; C 2; C 3; C 4; C 5; C 6; C 7; C 8; C 9 |
| Fragmente active ale complementului, generate de către proteinazele macrofagelor: C 3a; C 3b; C 5a; Bb |
| Calea alternativă: factorul B, factorul D, properdina |

*Factori de coagulare*

Calea intrinsecă: IX; X; V; protrombină

Calea extrinsecă: VII

Activitate antitrombocitară: inhibitori de plasmină; activatori ai plasminogenului

*Enzime proteolitice*

Metaloproteinaze: elastaze, colagenaze, gelatinaze, angiotensine, convertaze

Serin-proteinaze: urokinaza, activator de plasminogen

Aspartil-proteinaze: catepsina D

Cistein-proteinaze: catepsina B, catepsina L

*Alte enzime*

- Lipaze: fosfolipaze, lipoproteinaze
- Glucozaminidaze: lizozim
- Hidrolaze acide lizozomale: proteaze, lipaza, fosfataze, sulfataze, glicozidaze
- Deaminaze: arginaze

*Inhibitori ai enzimelor*

- Inhibitori proteinazici: $\alpha_2$- macroglobulina, inhibitorul de plasmină
- Inhibitori fosfolipazici: lipomodulina

*Proteinele de adeziune celulară*

- Fibronectina, trombospondina, proteoglicani, condroitin-sulfaţi şi heparin-sulfat

*Alte proteine de legare*

- Pentru metale: transferina
- Pentru vitamine: transcobalamina II
- Pentru lipide: apolipoproteina E
- Pentru factori de creştere: proteine de legare a TGF-$\beta$
- Pentru biotină: avidina

*Lipide bioactive*

- Produse ciclooxigenazice: $PGE_2$, $PGI_2$, $PGF_{1\alpha}$ $PGF_{2d}$ , prostacicline tromboxan
- Produse lipooxigenazice: leucotriene ($LTB_4$ , LTC, LTD etc.)
- PAF (platelet agglutinating factor)

*Alte substanţe*

- Oligopeptide: glutation
- Hormoni steroizi
- Purine şi pirimidine: timidină, uracil, acid uric, cAMP
- Oxigeni intermediari: $O^{-}_2$ ; $OH^-$; $\cdot O_2$ , $H_2O_2$
- Nitrogeni intermediari: nitriţi, nitraţi

Unele sunt secretate consecutiv sintezei lor active induse de diverşi stimuli, în timp ce altele, presintetizate, sunt doar eliberate. Astfel, hidrolazele acide, prezente în lizozomi, pot fi eliberate chiar şi în absenţa oricărui stimul. În cazul stimulării cu unele complexe imune, ca pereţi ai bacteriilor, particule minerale, componente ale complementului etc., se pot sintetiza activ astfel de enzime, care apoi sunt secretate. De asemenea, secreţia lizozomului se poate face şi în absenţa unor stimuli, dar ea este amplificată atunci când celulele sunt activate de stimulări exogene, nivelul seric al acestuia putând constitui un indicator al activităţii fagocitare a macrofagelor. În alte cazuri, eliberarea produselor precum şi sinteza lor nu are loc decât ca urmare a stimulării celulare. De exemplu, "factorul de necroză al tumorilor" (TNF) este sintetizat şi secretat numai atunci când şoarecii au fost stimulaţi cu BCG şi după o lună de zile cu LPS.

*Tabelul 29*

**Citokine care modulează fenotipul macrofagelor (după S. Gordon şi col.)**

| Citokina | Sursa | Efectul asupra macrofagelor |
|---|---|---|
| Interleukin-1 (IL-1) | Macrofage activate | - Eliberare de IL-1, TNF, CSF<br>- Creşte abilitatea de răspuns la factori de creştere şi de diferenţiere, acţionând într-un stadiu mai târziu al diferenţierii |
| TNF - $\alpha$ caşectină | Macrofage<br>Limfocite *T* | - Eliberare de PAF, IL-1, PGE2 |
| IL - 3 | Limfocite *T* | - Rol chemotactic<br>- Creşterea şi diferenţierea promonocitelor<br>- Creşte numărul macrofagelor în circulaţie şi ţesuturi |
| IL - 4 | Limfocite *T* *CD* 4$^+$ | - Activează prezentarea antigenului, exprimarea receptorilor *Fc* pentru IgE, moleculelor MHC de clasa II, fuziunea celulară |
| M-CSF | Macrofage<br>Fibroblaste | - Creşterea şi diferenţierea promonocitelor<br>- Activarea sintezei de urokinază |
| GM-CSF | Macrofage<br>Limfocite *T*<br>Celule endoteliale | - Creşterea şi diferenţierea promonocitelor<br>- Activează pătrunderea monocitelor în ţesuturi |
| IFN - $\alpha$ | Leucocite | - Activare antivirală |
| IFN - $\beta$ | Fibroblaste | - Modularea activităţii macrofagelor |
| IFN - $\gamma$ | Limfocite *T* | - Activarea funcţiilor antivirale, respiratorii, a exprimării antigenelor MHC de clasa II, scăderea MFR |
| TGF $\beta$ | Macrofage<br>Trombocite | - Eliberarea de factori de creştere, chemotactism crescut |

Până în prezent, nu sunt cunoscute modalităţile de control celular al mecanismelor care reglează sinteza şi eliberarea produselor secretorii ale macrofagelor şi maniera de influenţare a acestor evenimente de către diferiţi factori ai inflamaţiei, dar se ştie precis că aceste produse secretorii joacă un rol important în apărarea organismului.

**Funcţiile citotoxic-citostatice ale macrofagelor** pot fi exercitate asupra unor celule ţintă diferite, independent de cele fagocitare. Macrofagele îşi pot exprima potenţialul citotoxic nespecific, selectiv sau specific, în sensul că pot ucide orice fel de celulă străină sau numai anumite celule străine, pe care le pot recunoaşte fie selectiv, fie prin mijloace specifice. Citotoxicitatea nespecifică are probabil ca obiectiv distrugerea diferitelor celule îmbătrânite, infectate, transformate, care sunt recunoscute şi ucise prin mecanisme dependente sau independente de oxigen. Pentru aceasta este suficient ca celulele efectoare să recepţioneze semnale adecvate pentru a fixa şi ucide ţinta.

*Citotoxicitatea nespecifică* dar selectivă presupune o "selectare" a ţintelor şi atacarea cu prioritate a celor pentru care macrofagele au o "susceptibilitate" anumită. Ea este efectuată de către macrofagele activate, care devin capabile să recunoască mai activ şi să reacţioneze la schimbările suferite de celula ţintă. Această activare este realizată de diverşi modulatori ai răspunsului imun, cum ar fi LPS, muramil-dipeptidul, acidul poliinosinic-policitidilic ( poli I:C) etc. Acestea transmit semnale chimice care vor acţiona asupra membranei celulare influenţându-i compoziţia, modul de organizare, starea fizică a lipidelor din compoziţia sa şi, în final, funcţiile acesteia. Astfel un ligand, care poate induce perturbarea fosfolipidelor de membrană, va contribui la realizarea de semnale transductoare de la exterior spre interiorul celulei. Pe lângă modularea semnalului transductor, starea fizică a dublului strat lipidic poate regla activitatea catalitică a enzimelor membranei, reacţiilor ei de fuziune etc. De exemplu, sub influenţa endotoxinelor bacteriene, macrofagele primesc un semnal chimic potent biologic de la diferite surse ubicuitare, care le face să capete proprietăţi tumoricide şi le activează secreţia unor molecule cu activitate de stimulare a proliferării lor. Este un mecanism de reglare care le permite controlul proliferării propriilor precursori şi, deci, asigurarea numărului necesar de celule pentru realizarea supravegherii imune.

Desigur, intervin şi factori care pot inhiba activitatea citotoxică, unii dintre ei eliberaţi de către celula ţintă, alţii de către alte surse. Astfel, celulele tumorale secretă prostaglandine care au efecte inhibitorii asupra funcţiilor imune şi care activează sinteza cAMP. Indometacinul, care inhibă sinteza prostaglandinelor, va activa citotoxicitatea. În ţesutul neoplazic, sunt macrofage "asociate tumorii" care pot favoriza proliferarea tumorii prin generarea de vase de neoformaţie şi activitate procoagulantă urmată de depunerea de fibrină. Aceste celule nu produc IL-1 sau TNF. În schimb, macrofagele activate sunt citotoxice, efect manifestat în special ca urmare a producerii de TNF, IL-1, M-CSF şi speciilor reactive de oxigen.

*Citotoxicitatea specifică* este realizată de către macrofagele aflate sub influenţa limfocitelor *T*. Dovada existenţei ei este eliminarea cozii de mormoloc. Aceasta este distrusă de către enzimele lizozomale secretate de către macrofagele care au primit un semnal din partea celulelor care urmează să fie distruse, adică din partea celulelor cozii. Este posibil ca şi celulele tumorale sau alte celule transformate să fie capabile să elibereze astfel de semnale care să inducă activarea macrofagelor. Un alt mecanism de citotoxicitate specifică efectuat de către macrofage este cel anticorpo-dependent, în care specificitatea este conferită de către anticorpii anti-celula ţintă.

În afară de funcţiile citotoxice, macrofagele au şi activitate citostatică, de blocare a creşterii celulelor, în special a celor neoplazice. De fapt, primul efect al macrofagelor asupra celulelor tumorale este cel citostatic, de blocare a multiplicării ţintei. Ea intervine în primele 24 de ore, fiind apoi înlocuită de funcţia citotoxică. Este necesar un contact direct între macrofag şi ţintă, contact care să permită fuzionarea lizozomilor cu celula ţintă (fig. 44).

În linii mari, sistemele citotoxice ale fagocitelor mononucleare sunt similare celor menţionate la granulocitele polimorfonucleare: unele sunt oxigen-dependente iar altele, oxigen-independente. Şi unele şi altele contribuie la anihilarea agresorului şi la menţinerea homeostaziei.

**Funcţiile reglatoare ale macrofagelor.** În răspunsul imun, aceste celule intervin ca elemente pivot care recunosc, captează, prelucrează antigenul şi-l prezintă în forma sa imunogenă limfocitelor. Ele deţin însă şi unele funcţii reglatoare care, în linii mari, sunt expresia acţiunii lor directe fie asupra antigenului, fie

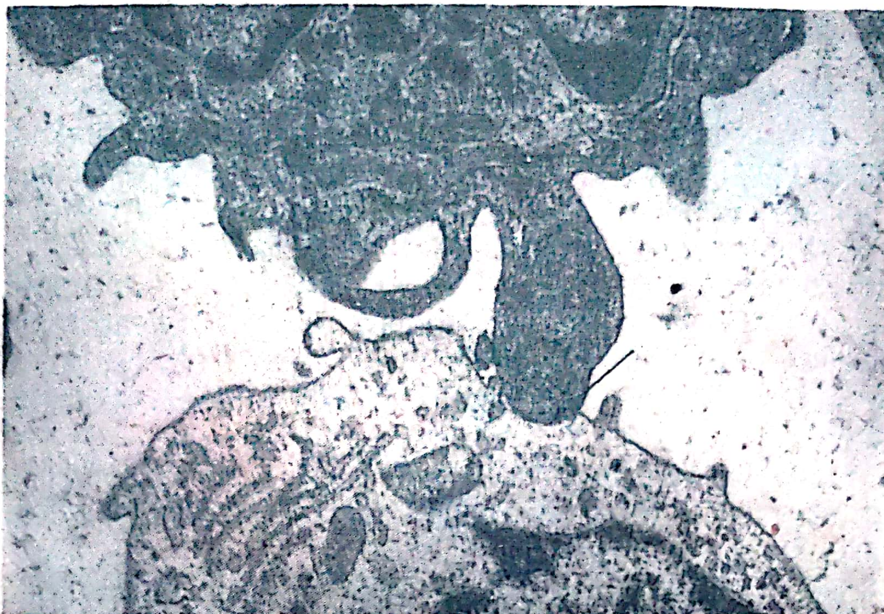


Fig.44. Pentru uciderea celulei ţintă, este necesar contactul intim între celula ucigaşă şi ţintă (săgeata). Microscopie electronică, transmisie directă, 22 000 x.

asupra celorlalte componente ale sistemului imun. Astfel, macrofagele fagocitează non-propriul şi-l elimină din organism anulându-i efectele nocive. Prin digestie moderată intracitoplasmatică, creează "stocuri" de epitopi care realizează un anumit prag de concentraţie, prag care permite declanşarea reacţiilor imune. Cu alte cuvinte, se evită toleranţa de "zonă joasă" datorită insuficienţei stimulului antigenic. Totodată, prin reţinerea antigenului la nivelul fagolizozomilor şi eliberarea lor treptată, se evită "sufocarea" limfocitelor de către stimuli în exces, deci toleranţa de "zonă înaltă".

Asupra celorlalte componente ale sistemului imun acţionează prin eliberarea de mediatori solubili precum şi prin intervenţia unor subpopulaţii de macrofage cu funcţii supresoare care intervin direct în mecanismele de reglare.

Monocitele şi macrofagele aderă selectiv la endoteliul aortei la subiecţii hipercolesterolemici, contribuind la eliminarea parţială a colesterolului, depozitează ionii de Fe, unele gangliozide, lipide etc. Joacă rol de reglator în diferenţierea celulelor hematopoietice, contribuie prin TGF$\alpha$- şi TGF-$\beta$ ("transforming growth factor") la vindecarea rănilor, prin TNF-$\alpha$ induce angiogeneza, prin NGF ("neuronal growth factor") creşterea nervilor iar prin fibronectină şi prin condroitin- sulfat reglează formarea matriţelor exocelulare. Aceste celule joacă un rol important în controlul şi reglarea unui număr important de funcţii ale limfocitelor, asupra cărora au efecte activatoare sau supresoare. De exemplu, ele consumă cistină şi generează tiol solubil al cărui constituent major este cisteina. Creşterea concentraţiei de cisteină influenţează puternic activitatea limfocitelor *T* citotoxice ($CD8^+$), sinteza ADN etc. Cisteina are un rol reglator asupra răspunsului imun, eliberarea ei de către macrofage în cantităţi variabile contribuind la reglarea funcţiilor limfocitelor din imediata vecinătate. Bineînţeles că acest rol reglator este amplificat de multitudinea de monokine secretate de către aceste celule care conferă proprietăţi imunostimulatoare macrofagelor, atât prin eliberarea de "factori activatori" ai limfocitelor, cât şi prin prezentarea antigenului într-o formă "înalt imunogenă".

Dar, au şi acţiuni supresoare, cu rol important în generarea energiei care însoţeşte competiţia antigenică, infecţiile T.B.C., fungice etc. Macrofagele supresoare sunt prezente la purtătorii de plasmacitoame, fiind foarte active în eliberarea unor factori supresori ca IFN, arginază, prostaglandine, sau alte molecule supresoare.

## ASTROCITELE

Sistemul nervos central este bine izolat prin bariera hematoencefalică, motiv pentru care accesul limfocitelor este blocat iar exprimarea antigenelor MHC este aproape nulă. Cu toate acestea, aici au loc reacţii imune locale, în special antivirale, celulele care ar putea avea rol de pivot în interacţia dintre limfocitele *T* şi neuroni fiind astrocitele. Acestea ghidează dezvoltarea axonilor, controlează mecanismele homeostatice, efectuează funcţii de prezentare a antigenului, au activitate fagocitară şi secretorie. Pot produce enzime, prostaglandine, interleukin-6 şi pot prezenta antigenul celulelor *T* sub restricţia MHC, proces în timpul căruia devin $DR^+$ şi $ICAM\text{-}1^+$ ca urmare a efectului retroactiv exercitat de celulele *T* asupra lor.

Ar fi două tipuri celulare: tipul 1 poligonal, dominant în sistemul nervos, şi tipul 2, mai slab reprezentat. Sunt de origine diferită şi se deosebesc între ele prin modul de exprimare a canalelor de $Na^+$ şi $K^+$.

Au terminaţii lungi, care se prelungesc până la celulele endoteliale ale vaselor, prin care transmit semnalele necesare formării joncţiunilor dintre ele şi celulele ependimale, oligodendrocite, neuroni etc. Interacţiunile sunt mediate de factori de creştere şi molecule de adeziune ca gangliozide, glicosfingolipide bogate în acid sialic etc. Au receptori pentru apolipoproteina E produsă în creier, norepinefrine, bradikinine, histamine, ATP. Rolul lor încă nu este bine cunoscut.

## CELULELE LANGERHANS

Derivă din măduva osoasă şi au un pronunţat aspect de celule dendritice, deosebindu-se de acestea printre altele şi prin prezenţa granulelor *Birbeck* în citoplasma lor. Datorită faptului că au ATP-ază, esteraze, receptori pentru complement, receptori *Fc*, se aseamănă cu macrofagele, de care se deosebesc prin poziţia lor predilectă în organism (în piele).

Stimulează potent limfocitele *T*. Prin cultivare *in vitro,* pierd capacitatea de prelucrare a antigenului fiind, ca şi celulele dendritice, inductoare ale răspunsului imun primar, dar nu şi secundar. Proaspăt izolate, pot prelucra eficient antigenul în vederea prezentării limfocitelor *T,* fapt ce sugerează că *in vivo* funcţiile lor de celule APC sunt mai complexe.

Au rol central în modularea răspunsului imun faţă de *Leishmania,* înglobând parazitul şi transportându-l către ganglionii limfatici regionali pentru a fi prezentat limfocitelor *T*.

## CELULELE SERIEI LIMFOCITARE

Sunt celule care recunosc şi reacţionează cu "non-propriul" prin intermediul receptorilor de membrană pentru antigene. O celulă are receptori care vor recunoaşte un determinant antigenic unic, populaţia limfocitară aparţinând la atâtea grupe (clone=ramuri), cu receptori de membrană unici pentru antigen, câţi epitopi există potenţial în natură. Cele aproximativ $10^{12}$ limfocite existente în organismul uman de exemplu, care reprezintă 1-2% din greutatea corporală

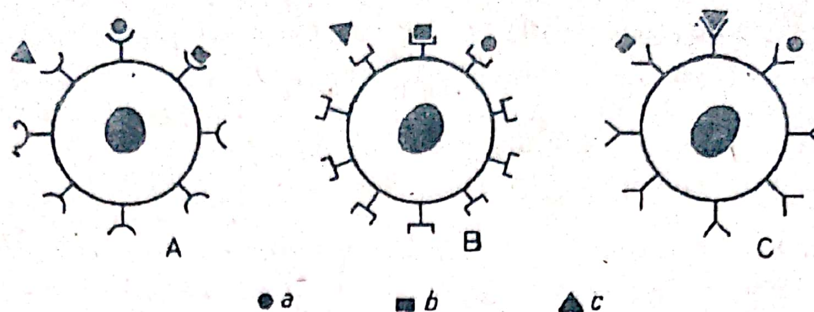



Fig.45. Limfocitele există sub formă de grupe de populaţii celulare (clone), fiecare având exprimat pe membrana plasmatică un singur tip de receptori pentru un singur epitop. De pildă, limfocitul *A* are receptori pentru *a*, limfocitul *B* pentru *b*, iar *C* pentru *c*. Receptorii limfocitului *A* nu pot recunoaşte şi lega epitopii *b* sau *c*, cei ai limfocitului *B* epitopii *a* sau *c* etc.

(cca. 700-1 200g), ar aparţine la cca. $10^8$ clone care au receptori pentru epitopi diferiţi (fig. 45). O clonă cu receptori pentru un epitop dat poate fi alcătuită din una până la $10^7$ celule, numărul lor fiind condiţionat de intensitatea stimulului antigenic.

În trecut, limfocitele au fost clasificate pe baza unor criterii diferite ca: mărime, susceptibilitatea la corticosteroizi, durată de viaţă etc. Astfel, sunt limfocite mici ( 6 $\mu$m) şi mari (12 $\mu$m), rezistente sau sensibile la corticosteroizi, cu durata de viaţă scurtă (de ordinul câtorva săptămâni) sau lungă (de ordinul anilor sau zecilor de ani) etc. Dar, aceste caractere nu întotdeauna sunt expresia unor deosebiri reale care definesc subpopulaţii celulare diferite, ci doar deosebiri de moment, legate de anumite stadii de evoluţie a unei celule. De exemplu, o celulă în diviziune poate apărea ca un "limfocit mare", pentru ca la sfârşitul ei să fie un "limfocit mic". Toate celulele sistemului imun derivă din celula matcă pluripotenţială evoluând spre două linii principale de diferenţiere: una mieloidă, din care vor descinde fagocitele şi alte celule, şi alta limfoidă, care va genera cele două clase majore de

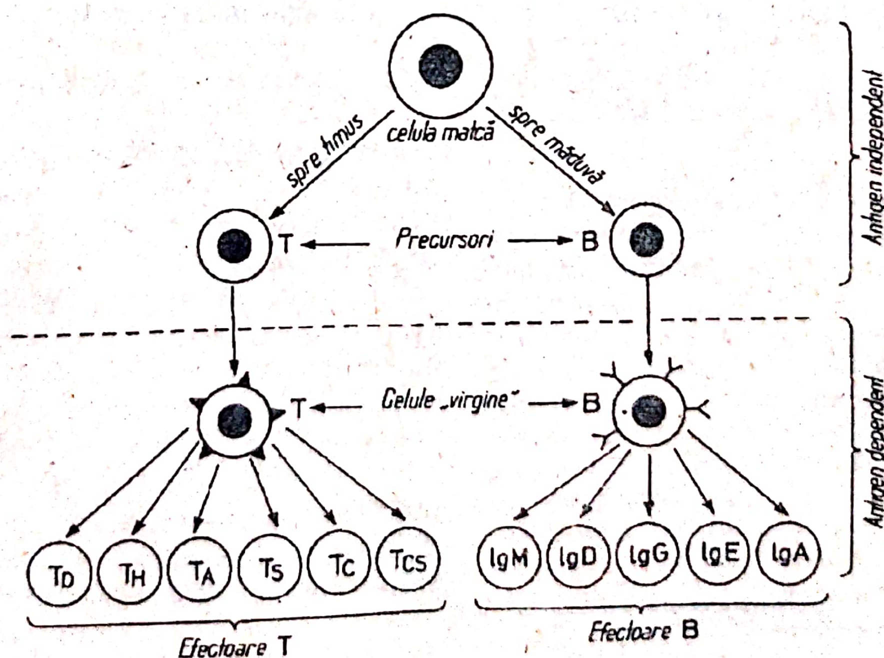



Fig.46. Celulele din seria limfoidă descind din celula matcă pluripotentă funcţional. În primele stadii de dezvoltare, multiplicarea lor se face în absenţa stimulului antigenic. După exprimarea receptorilor, devin celule imunocompetente *T* sau *B*, "virgine", care se vor multiplica numai consecutiv stimulului antigenic.

limfocite, şi anume limfocitele *T* şi *B* (fig. 46). Celulele *T* se diferenţiază iniţial în timus, iar cele *B* la păsări în bursa lui Fabricius, iar la mamifere, în timpul vieţii embrionare în splină şi ficatul embrionar, şi în timpul vieţii adulte, în măduva osoasă. În afară de aceste două clase, mai există o altă populaţie care nu are toate caracteristicile limfocitelor *T* sau ale celor *B*, a căror diferenţiere este însă insuficient elucidată. Ele ar putea fi de origine mieloidă sau limfoidă, sau pot reprezenta o linie de maturare distinctă sau stadii diferite de maturare. Reprezintă populaţia de limfocite non-*T*, non-*B*, denumite mai de mult şi "clasa a III-a", care se deosebesc de celulele *T* şi *B* prin granulele lor intracitoplasmatice şi alte caractere morfologice şi funcţionale.

În sângele periferic, la persoanele normale, se găsesc cca. $1 \times 10^6$ limfocite/ml, valoare constatată după separarea lor prin centrifugare în gradient de densitate. Depăşirea semnificativă a acestei valori semnalează existenţa unei stări patologice, ca de pildă leucemia acută sau cronică. Revenirea spre limite normale a acestor valori la leucemici este un indiciu de ameliorarea stării de sănătate (fig. 47).

Refacerea limfocitelor în sistemul imun este de cca. 5% pe zi. De exemplu, la un şoarece adult, din cele cca. $10^9$ limfocite *B*, zilnic se regenerează cca. $5 \times 10^7$ celule care înlocuiesc pe cele cca. $5 \times 10^7$ celule dispărute.

Dacă morfologic limfocitele *T* şi *B* sunt identice, funcţional sunt extrem de eterogene. Ele sunt celule mici, agranulare, cu un raport mare între nucleu şi citoplasmă, pe când celulele non-*T*, non-*B* au un raport nucleu/citoplasmă (N/C) mic şi conţin granule azurofile intracitoplasmatice, din care cauză au fost denumite limfocite granulare mari sau celule LGL ("large granular lymphocites").

Populaţiile de celule mici *T* şi *B*, deşi sunt similare morfologic, se deosebesc între ele atât funcţional cât şi antigenic. Mai mult, chiar în cadrul claselor *T* şi *B* există subclase cu proprietăţi funcţionale şi antigenice diferite derivate din precursorii antigen-reactivi ai celulelor efectoare generate în organele limfoide primare şi în circulaţie unde, după ce vin în contact cu antigenul, suferă un alt ciclu de diferenţiere, care le orientează spre capacităţi funcţionale distincte.

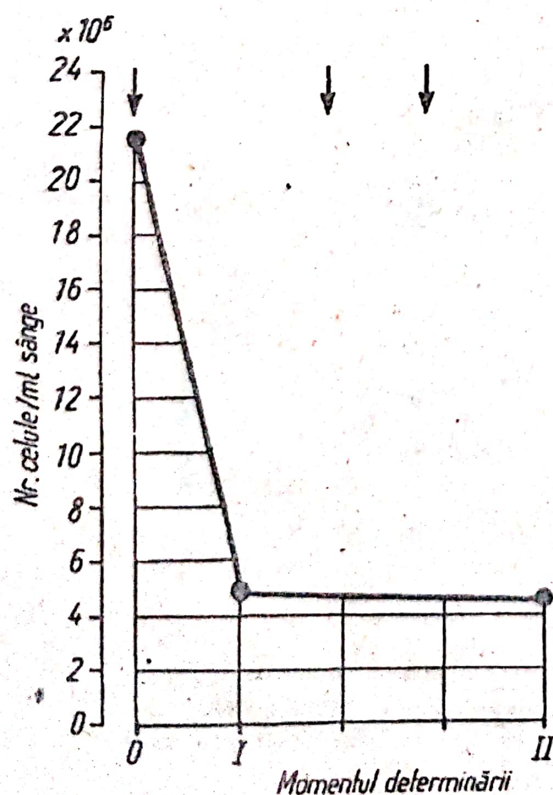



**Fig.47. Dinamica numărului de limfocite/ml de sânge la un pacient cu leucemie limfatică cronică T (LLCT).**

**Pacientul avea un număr mare de limfocite în circulaţie (cca. $22 \times 10^6$/ml de sânge). După terapia imunomodulatoare cu Cantastim (săgeţile), numărul celulelor a scăzut semnificativ, apropiindu-se de valorile normale.**

Dezvoltarea celulelor *T* mature în timus implică schimbări în reglarea unui mare număr de gene, unele fiind represate iar altele activate. Un set important de gene care este exprimat în timus va codifica sinteza şi exprimarea receptorilor pentru antigen. Dar această exprimare nu este suficientă pentru ca celula *T* să devină matură. Pentru aceasta, este necesară exprimarea altor gene, ca de pildă cele care controlează sinteza IL-2, IL-4, IL-5, IFN, perforinelor etc.

În cursul maturării lor, celulele *T* vor căpăta sau pierde, ca o expresie a depresiei sau represiei genice, o serie de molecule de suprafaţă care le vor defini din punct de vedere funcţional şi antigenic (vezi cap. "Markeri şi receptori").

Intratimic suferă două selecţii, în cursul cărora sunt eliminaţi precursorii necorespunzători. Iniţial este o selecţie "pozitivă" în timpul căreia sunt eliminate celulele care nu pot recunoaşte moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC) proprii organului respectiv. Aceste molecule au rol esenţial în prezentarea şi recunoaşterea antigenelor străine de către limfocitele *T*. Dacă nu pot recunoaşte MHC propriu, nu vor fi capabile să recunoască şi să neutralizeze antigenul străin, fiind deci nefuncţionale.

Urmează o a doua selecţie "negativă", în cursul căreia sunt eliminate celulele care recunosc antigenele propriului organism. Eliminarea lor duce la evitarea reacţiilor de autoimunitate. În caz că ar fi tolerate în continuare, aceste celule ar deveni nocive pentru ţesuturile organismului din care fac parte. Sunt tolerate şi ajung în circulaţia periferică numai progenitorii care recunosc MHC propriu şi antigenele străine (fig. 48).

Deci, din punct de vedere funcţional, limfocitele *T*, ca de altfel şi cele *B*, se pot afla în următoarele stadii de maturare:

*a. Progenitori* sau *precursori* celulari, care nu exprimă pe suprafaţa lor nici un fel de receptori, poate cu excepţia receptorilor pentru ecotaxie. Sunt celule foarte tinere, lipsite de funcţii, comparabile cu sugarii care mai au mult de crescut şi învăţat până la maturitate.

Unele dintre aceste celule se găsesc în circulaţie, aflându-se în drum spre organele limfoide primare, altele se găsesc în interiorul acestor organe, în diferite stadii de maturare (precursori celulari).

*b. Celule virgine* sau *naive,* care şi-au căpătat imunocompetenţa, deci care pot neutraliza antigenul, dar care încă nu au avut ocazia să-şi exercite funcţiile deoarece nu au venit în contact cu acesta.

*c. Celule efectoare,* care au venit în contact cu antigenul şi care, după neutralizarea lui, devin celule de memorie, păstrând "amintirea" acestui contact, astfel că, la reîntâlnirea cu acelaşi antigen, potenţialul lor de reacţie este mult sporit.

După căpătarea imunocompetenţei în timus, limfocitele *T* ajung în circulaţie unde

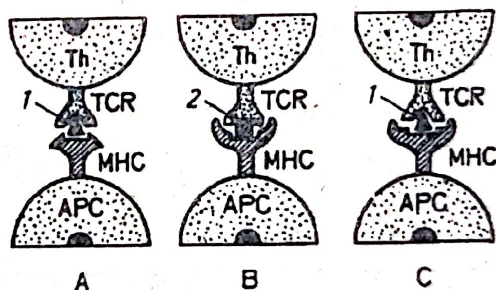



Fig.48. Reprezentarea schematică a modalităţilor de realizare a "selecţiei pozitive" şi "negative" în cursul educării precursorilor limfocitelor T.

A. În cursul "selecţiei pozitive" sunt eliminate limfocitele T care exprimă receptori pentru antigen ce nu pot recunoaşte moleculele complexului major de histocompatibilitate (MHC) specifice propriului organism, putând recunoaşte doar epitopul (1).

B. În cursul "selecţiei negative" sunt eliminaţi progenitorii limfocitelor T care recunosc MHC propriu dar şi epitopii propriului organism (2). Odată maturate, aceste celule ar genera boli autoimune.

C. Precursorii recunosc epitopul străin (1) şi MHC propriu. Celulele sunt acceptate în vederea maturării.

vor îndeplini funcţii efectoare (citotoxice, de hipersensibilitate de tip "întârziat" etc.) sau reglatoare (ajutătoare sau "helper", amplificatoare, supresoare, contra-supresoare). Aceste subpopulaţii, deşi identice din punct de vedere morfologic, s-ar distinge din punct de vedere funcţional şi antigenic, subpopulaţiile cele mai marcante fiind cele ajutătoare ($CD4^+$) şi supresoare-citotoxice ($CD8^+$). Unii autori însă nu acceptă existenţa acestor subpopulaţii ca entităţi diferite, susţinând că ele nu sunt "linii celulare distincte", ci doar diferite stadii de maturare a aceleiaşi linii, care poate efectua în fiecare stadiu funcţii diferite, solicitând bineînţeles influenţa unor mediatori solubili diferiţi. Se acceptă ideea existenţei de celule *T* "naive" cu rol supresor şi de celule *T* de memorie cu rol inductor.

Studiul antigenelor de suprafaţă cu ajutorul anticorpilor monoclonali a evidenţiat existenţa la şoarece a unei glicoproteine denumită iniţial "glicoproteina fagocitară" (Pgp-1) şi ulterior Ly-24. S-a constatat că Ly-24 este exprimată atât la unele subpopulaţii imature *T* ($CD4^-$-$CD8^-$) cât şi la cele mature ajutătoare ($CD4^+$-$CD8^-$) sau supresoare ($CD4^-$-$CD8^+$), constatându-se că şi celulele supresoare au caracterele celulelor de memorie.

De fapt, celulele *T* de memorie, adică cele care au derivat din proliferarea clonei consecutiv stimulului antigenic, por fi identificate cu ajutorul unor determinanţi antigenici pe care-i exprimă pe membrana lor şi care sunt slab exprimaţi sau nu sunt exprimaţi deloc pe membrana celulelor imunocompetente, dar care nu au venit încă în contact cu antigenul, denumite pentru aceasta şi celule "naive". Chiar Pgp-1, găsită atât pe suprafaţa celulelor "mature" sau "de memorie", cât şi pe cea a celulelor "imature" sau "naive", este prezentă diferenţiat: bine exprimată pe celulele de memorie şi slab exprimată pe cele naive.

În afară de diferenţele antigenice, între celulele *T* "de memorie" şi cele "naive" există şi deosebiri funcţionale (tabelul 30).

*Tabelul 30*

**Diferenţe funcţionale între limfocitele T "naive" şi "de memorie"**
**(după A.N. Akbar şi col.)**

| Funcţia | Limfocite *T* | |
|---|---|---|
| | Naive | De memorie |
| Funcţia helper pentru producere i.g. | - | ++++ |
| Precursor al celulelor citotoxice (antigen-specifice) | + | ++++ |
| Precursor al celulelor citotoxice (aloantigen-specifice) | ++++ | ++++ |
| Celule efectoare citotoxice (aloantigen-specifice) | - | ++++ |
| Aderenţa la endotelii | + | ++++ |
| Răspuns la stimuli chemotactici | + | ++++ |
| Proliferarea indusă de stimuli alogenici | ++++ | ++++ |
| Proliferarea indusă de stimuli mitogenici | ++++ | + |
| Inducţia funcţiilor supresoare | ++++ | + |

Subpopulaţiile de limfocite *T* acceptate de către unii sau neacceptate de către alţii ca fiind entităţi funcţionale distincte, şi nu doar stadii evolutive de dezvoltare a unei populaţii unice, ar fi limfocitele ajutătoare ($T_h$), amplificatoare ($T_A$), supresoare ($T_S$), contrasupresoare ($T_{cs}$), citotoxice ($T_c$) şi de hipersensibilitate de tip întârziat ($T_D$).

**Limfocitele T ajutătoare** (*T*h sau "helper") ajută limfocitele *B* sau pe cele *T* citotoxice (*T*c) în exprimarea potenţialului lor funcţional. Existenţa lor a fost demonstrată în cursul unor experimente în care şoarecii iradiaţi letal, deci cărora li s-a distrus total populaţia de celule limfoide, erau stimulaţi cu hematii de oaie în condiţiile repopulării organismului lor (reconstituirii) cu diferite populaţii de celule limfoide. Astfel, dacă după iradierea letală li se injectau limfocite recoltate dintr-un organ limfoid secundar – splină sau ganglioni limfatici – animalele redeveneau capabile să răspundă la stimulul antigenic prin sinteză de anticorpi anti-hematie de oaie. După reconstituirea cu celule timice (precursori *T*), nu reacţionau imunologic. De asemenea, nu formau anticorpi anti-hematii de oaie dacă erau reconstituiţi cu celule din măduvă osoasă dar, în aceste condiţii, redeveneau capabili să sintetizeze anticorpi antipolizaharizi pneumococici. Dacă însă animalele erau reconstituite atât cu celule timice, cât şi cu celule din măduva osoasă, ele reacţionau imun la stimulii cu hematii de oaie. Ulterior, s-a demonstrat că anticorpii sunt sintetizaţi de către limfocitele *B* şi nu de *T*, acestora revenindu-le doar rolul de celule ajutătoare pentru *B*, de unde şi denumirea lor de limfocite *T*h.

O altă dovadă experimentală a existenţei subpopulaţiei de limfocite *T*h a fost obţinută prin timectomia neonatală care, eliminând limfocitele *T*, provoacă depresia răspunsului imun umoral faţă de antigenele timodependente, dar nu şi faţă de cele timoindependente, dovadă că eliminarea timusului a afectat celulele *T*, dar nu şi pe cele *B*. Dacă acestor animale li se transferă limfocite *T*, reactivitatea lor se normalizează, de unde concluzia că limfocitele *B* nu pot reacţiona la antigenele timodependente decât cu ajutorul celulelor *T*h.

Ar exista două subpopulaţii de limfocite *T*h care s-ar deosebi între ele atât prin posibilitatea de producere a unor citokine cât şi prin caracterul unor funcţii de apărare pe care le efectuează (tabelul 31). Aceste tipuri distincte fenotipic sunt denumite celulele *T* h1 şi *T* h2, ambele aparţinând populaţiei $CD4^+$

*Tabelul 31*

**Tipurile de celule T ajutătoare ($CD4^+$) la şoarece**

| Tipul celular | Funcţia |
|---|---|
| *T* h1 | - Secretă IL-2, IL-12, IFN$\gamma$, TNF$\beta$ |
| | - Nu secretă IL-4, IL-5 |
| | - Activează macrofagele în apărarea antiparazitară |
| | - Activează sinteza anticorpilor IgG2 dar nu IgE |
| | - Sunt implicate în reacţiile de hipersensibilitate de tip întârziat |
| | - Sunt activate de către semnalele primite de la virusurile sau bacteriile cu localizare intracelulară |
| *T* h2 | - Secretă IL-4, IL-5, IL-6, IL10 |
| | - Nu secretă IL-2, IFN$\gamma$, TNF |
| | - Activează sinteza de IgE |
| | - Stimulează proliferarea eozinofilelor |
| | - Sunt stimulate de către alergene sau componente parazitare |

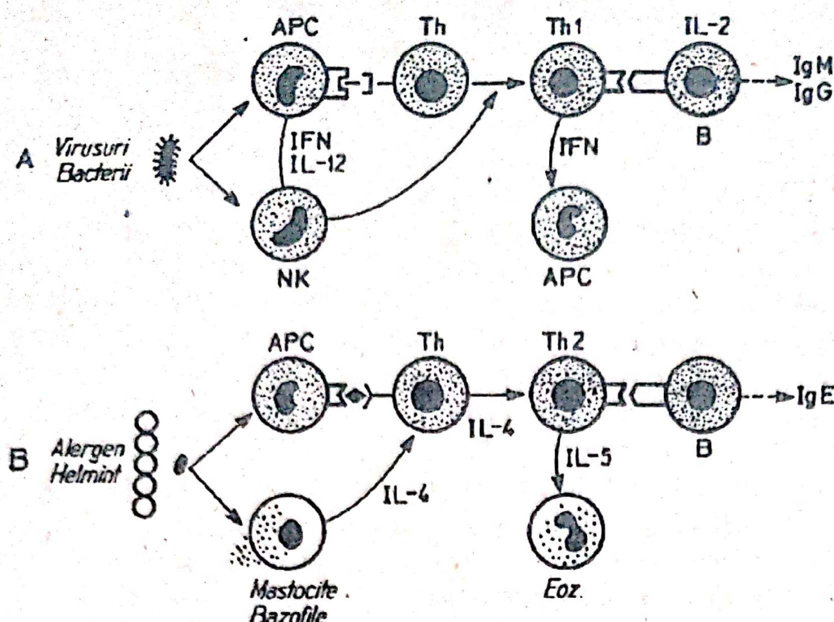



Fig.49. La şoarece ar exista două tipuri de celule ajutătoare *T*, unele activate de bacterii şi virusuri, iar altele de alergene şi helminţi (după S. Romagnani).

Bacteriile şi virusurile cu localizare intracelulară antrenează în răspunsul imun limfocitele de tip *T* $h_1$, pe când alergenele şi unele componente ale helminţilor promovează diferenţierea fenotipului *T* $h_2$ (fig. 49). La om nu a fost dovedită cu certitudine existenţa acestor două tipuri de limfocite ajutătoare, ele producând atât IL-2 şi IFN$\gamma$ cât şi IL-4, IL-5, adică întreaga paletă de molecule care sunt produse de diferite populaţii *Th* de la şoarece.

De altfel, nici la şoarece diferenţa dintre cele două tipuri celulare nu pare a fi absolută, deoarece au fost identificate clone care secretă atât IL-2 cât şi IL-5. Este posibil ca aceste clone "hibride" să fie precursoare ale subpopulaţiilor *T* $h_1$ şi *T* $h_2$ care ar reprezenta stadiile finale de diferenţiere a celulelor *T* ajutătoare.

De altfel, această populaţie de limfocite T ajutătoare poate fi divizată, după cum menţionam anterior, în celule naive (*T* $h_0$), efectoare şi de memorie. Dintre cele efectoare, sunt limfocitele *T* $h_1$ care intervin în răspunsul imun mediat celular şi umoral, şi *Th*$_2$ cu rol în declanşarea proceselor inflamatorii şi de hipersensibilitate (tabelul 32; fig.50).

*Tabelul 32*

**Principalele subseturi de limfocite CD4$^+$ murine (după F. Powrie şi R. L. Coffman)**

| Funcţia | Subsetul celular | | |
|---|---|---|---|
| | $Th_1$ | $Th_2$ | $Th_0$ |
| Ajutătoare pentru B | + | ++ | ++ |
| Ajutătoare pentru sinteza IgE | - | ++ | +/- |
| Activarea macrofagelor | ++ | - | ? |
| Rol în hipersensibilitatea de tip întârziat | ++ | - | ? |

| Funcția | Subsetul celular | | |
|---|---|---|---|
| | $Th_1$ | $Th_2$ | $Th_0$ |
| Sintetizează: - IL-2 | + | - | + |
| - IFNγ | ++ | - | ++ |
| - TNFβ | ++ | - | ? |
| - TNF | ++ | + | ? |
| - GM-CSF | ++ | + | + |
| - IL-3 | ++ | ++ | ++ |
| - IL-4 | - | ++ | ++ |
| - IL-5 | - | ++ | ++ |
| - IL-10 | - | ++ | ++ |
| - IL-13 | - | ++ | ? |

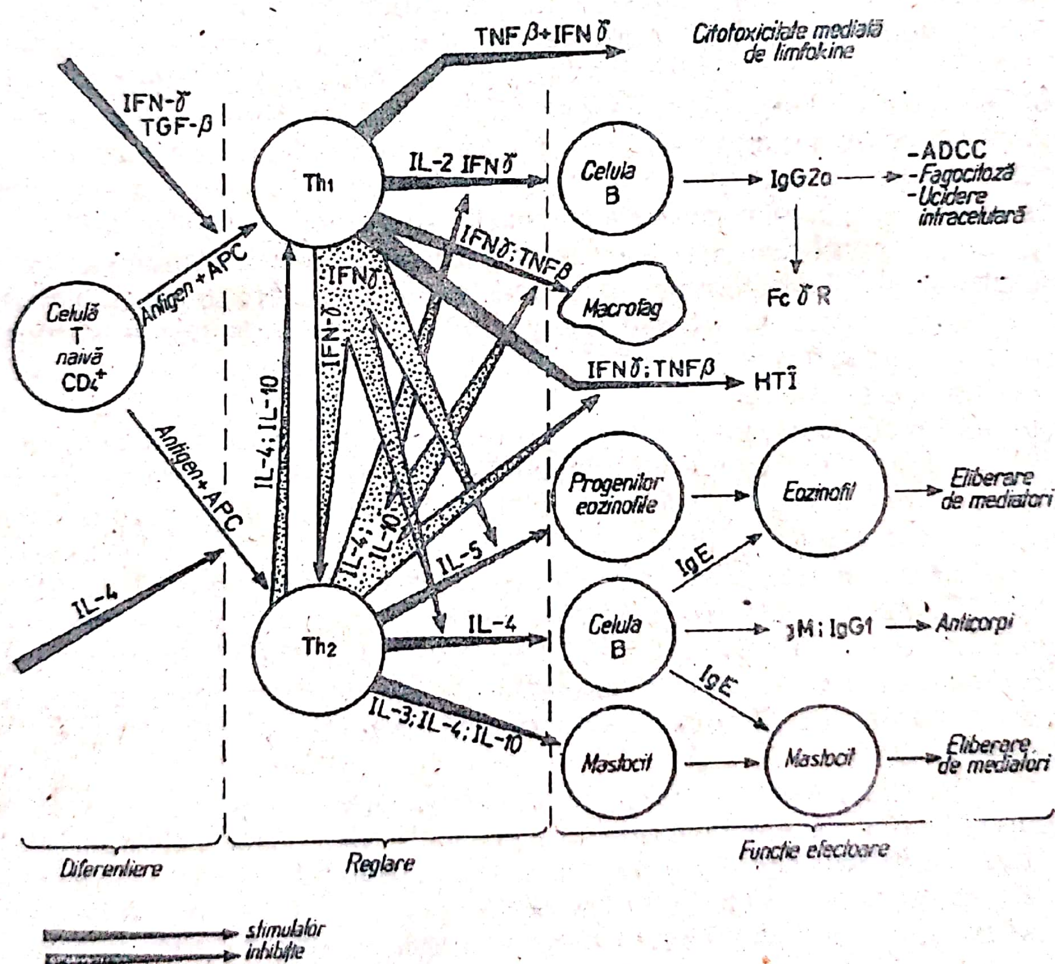



Fig.50. Principalele funcții și inductori care acționează asupra subclaselor $Th_1$ și $Th_2$ (după F. Powrie și R.L. Coffman).

Controlul acestor celule are loc la nivelul a trei stadii evolutive diferite: diferențiere; reglare și funcție efectoare.

**Limfocitele T amplificatoare ($T_A$ )** ale răspunsului imun au fost puse în evidenţă în circulaţia sangvină a şoarecilor în primele două-trei săptămâni de la naştere. Dacă şoarecii *Nu/Nu*, atimici congenital, sunt stimulaţi cu antigene timo-independente, ca de pildă polizaharizi pneumococici, răspunsul imun umoral se situează la cote normale, deoarece aceste antigene nu solicită şi prezenţa limfocitelor *T*. În cazul în care animalele primesc şi limfocite recoltate din circulaţia sangvină (dar nu din organele limfoide secundare) a şoarecilor tineri, titrul anticorpilor antipolizaharidici creşte semnificativ. Această activare a răspunsului imun demonstrează că animalele *Nu/Nu* au primit limfocite $T_A$ şi mai demonstrează că în circulaţia sangvină a sugarilor limfocitele *T* supresoare (*Ts* ) sunt fie puţine numeric, fie încă nu sunt funcţionale. Limfocitele $T_A$ activează selectiv diferenţierea şi multiplicarea celulelor *B*, care exprimă anumiţi receptori de membrană pentru antigene, făcând ca răspunsul imun faţă de anumite anti-gene simple să fie dominat de anticorpi cu anumite caractere idiotipice. De exemplu, moleculele de anticorpi antifosforil-colină din serul şoarecilor BALB/c sunt predominate de idiotipul *T*15, deoarece precursorii limfocitari purtând acest idiotip au fost amplificaţi funcţional de către $T_A$, care a acţionat selectiv pe anumite clone deja activate de către limfocitele *Th*.

**Limfocitele T supresoare (Ts )** au rol important în reglarea răspunsului imun, deoarece menţin în graniţe normale intensitatea reacţiilor imune şi, implicit, proliferarea celulelor limfoide. Existenţa acestor celule a putut fi demonstrată prin experimente *in vivo* şi *in vitro*. Se ştie că şoarecii *Nu/Nu* pot sintetiza anticorpi antihematie de oaie numai dacă primesc limfocite *Th* din splina şoarecilor adulţi normali. În cazul antigenelor timo-independente, nu au nevoie de transfer de limfocite *T*. Dacă totuşi primesc limfocite din splină sau din ganglionii şoarecilor adulţi normali, răspunsul la antigenele timo-independente este inhibat deoarece, pe lângă celulele *Th*, de care în cazul acestor stimuli nu era nevoie, animalele au primit şi celule *Ts* care au supresat reacţiile imune, eliberând nu semnale "pozitive", ca în cazul *Th*, ci semnale "negative". Dacă se amestecă *in vitro* limfocite recoltate de la persoane cu leucemie limfoblastică *T* cu limfocite de la persoane normale, răspunsul limfocitelor la un stimul cu PWM sau PHA este slab, proliferarea celulară fiind cu mult sub nivelul celei înregistrate în cazul stimulării celulelor recoltate de la subiecţi normali. Dacă, însă, celulele leucemicilor au fost distruse prin iradiere sau prin tratare cu ser anti-limfocite *Ts* (*CD*8), răspunsul la mitogene atinge valorile normale. De asemenea, limfocitele şoarecilor care în mod "normal" nu răspund la un stimul cu tripolimerul GAT (glutamină+albumină+tirozină) devin reactive după tratarea lor cu un ser antilimfocite *T* de şoarece (anti Thy-1). Şi într-un caz şi în celălalt, celulele şi-au recăpătat potenţialul reactiv normal deoarece prin iradiere sau prin tratament cu ser antilimfocitar au fost distruse limfocitele *Ts* care "frânau" răspunsul imun.

Ar exista un adevărat circuit "*T* supresor" generat de nişte celule "inductoare" ale supresiei (*Tsi*) care ar acţiona asupra precursorilor *Ts*, ambele tipuri de celule fiind radiosensibile. Circuitul *T* supresor ar fi compus din trei seturi de celule *Ts*: $Ts_1$, $Ts_2$ şi $Ts_3$ care ar intra în funcţie secvenţial, următoarea celulă fiind activată de precedenta fie direct, fie prin mediatori solubili sau "factori de inducere a supresiei".

Circuitele supresoare, deşi universale, pot adopta căi diferite de exprimare care ar condiţiona calitatea de "reactant" sau "nereactant" la un antigen dat. La animalele nereactante activarea *Ts* poate fi extrem de rapidă şi, deci, "frânarea" răspunsului imun maximă, pe când la cele reactante, activarea ar fi lentă. Se pare că şi recunoaşterea antigenului s-ar face diferit în cazul limfocitelor *Ts* care, spre

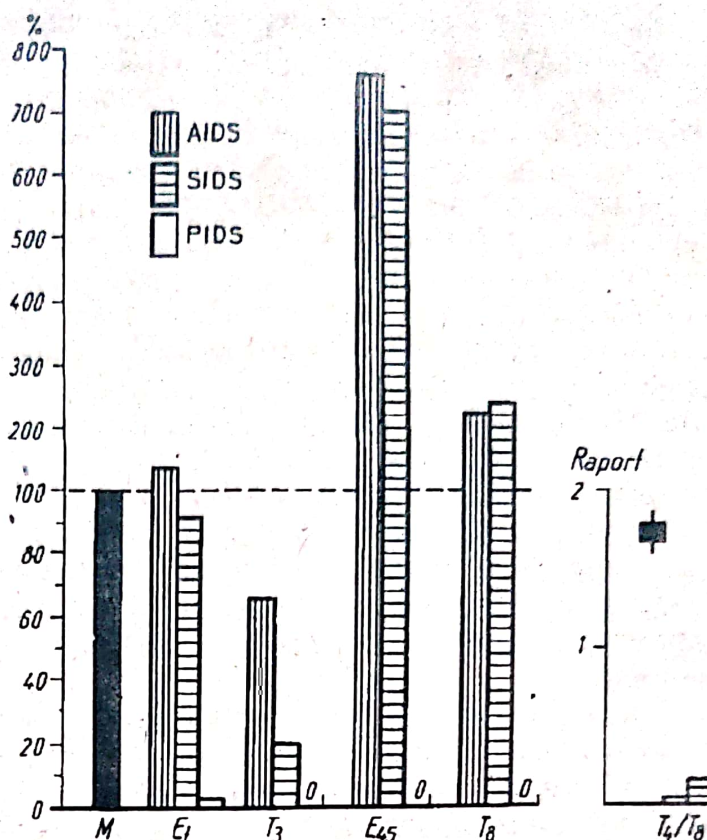



Fig.51. Procentul de limfocite *T* (întreaga populaţie de limfocite *T*), de *T* supresoare (E45) şi raportul *Th*/*Ts* exprimat ca *T4*/*T8* la bolnavi cu AIDS, cu imunodeficite induse accidental (SIDS) sau cu atimie congenitală (PIDS). Valorile sunt raportate procentual la valorile normale (M), considerate arbitrar ca fiind egale cu 100. Se observă absenţa totală a limfocitelor *T* la PIDS, valori aproape normale ale populaţiei *T* totale atunci când au fost identificate prin metoda rozetelor E (Et), dar mult mai scăzute atunci când au fost identificate cu anticorpi monoclonali CD3 (T3). Procentul limfocitelor *Ts* este cu mult peste valorile normale, raportul *Th*/*Ts* foarte scăzut (cca. 0,36) reflectând distrugerea celulelor *Th*.

deosebire de cele *Th* sau *B*, îl pot recunoaşte independent de MHC, celula APC neprezentându-l limfocitelor *Ts*, ci probabil celor *Tsi* . Limfocitele *Ts* ar interveni în competiţia antigenică de tip secvenţial, în diminuarea funcţiilor citotoxice ale celulelor care au astfel de funcţii, în inducerea paraliziei de zonă joasă etc. De exemplu, între două antigene inoculate la un anumit interval de timp, deci secvenţial, există o competiţie.

Răspunsul imun faţă de cel de al doilea antigen este mai slab, deoarece primul inoculat a mobilizat, în afară de celulele efectoare, şi celulele supresoare, astfel încât în momentul inoculării, care este critic pentru instalarea competiţiei antigenice, al doilea antigen găseşte deja un prag crescut de celule *Ts* care inhibă funcţiile limfocitelor din clona cu receptori pentru antigenul respectiv. Dintre factorii care favorizează proliferarea şi activarea funcţională a limfocitelor *Ts* sunt: dozele mici de antigen, persistenţa prelungită a antigenelor în organism, incapacitatea macrofagelor de a capta sau prelucra antigenul etc.

La oamenii sănătoşi, raportul dintre limfocitele *Th* şi cele *Ts* este de 1,5-2, adică există cca. două limfocite *Th* la o celulă *Ts*. În unele boli, acest raport poate fi puternic modificat (fig. 51).

**Limfocitele T contrasupresoare (Tcs)** contracarează activitatea celor *Ts*, acţionând sinergic cu celulele efectoare ale răspunsului imun sau cu cele *Th*. În declanşarea funcţiilor *Tcs* ar interveni o cascadă de activităţi secvenţiale care ar activa iniţial o populaţie de celule *T* inductoare ale contrasupresiei (*Tics*) care, la rândul lor, vor activa o altă populaţie de celule *T* traducătoare a contrasupresiei (*Tcst*), ce va traduce semnalul şi va declanşa funcţional celulele *Tcs*. Acestea, cel puţin ca speculaţie teoretică, fie că vor acţiona asupra celulelor *Ts* suprimându-le activitatea şi deblocând efectul inhibitor pe care-l exercită asupra celulelor ţintă T,B etc., fie că vor acţiona direct asupra ţintei activând-o funcţional.

**Limfocitele T citotoxice** acţionează direct şi specific asupra celulelor alogene cu complex MHC diferit de cel propriu, precum şi asupra celor singene modificate datorită unor infecţii virale, procese neoplazice etc., lizându-le. Limfocitele *Tc* acţionează asupra ţintei, respectând legile de bază ale răspunsului imun, şi anume: recunoaşterea specifică a epitopilor de pe suprafaţa celulei ţintă prin receptori de membrană pentru antigen, proliferarea clonală, apariţia celulelor de memorie etc. Pentru ca efectul citotoxic să poată avea loc, este necesară existenţa unui contact direct între celula *Tc* şi ţintă, uciderea făcându-se în absenţa anticorpilor şi complementului. Procesul citotoxic recunoaşte mai multe faze distincte, şi anume: a) recunoaşterea celulei ţintă şi ataşarea prin receptorii de membrană la ea (proces obligatoriu, uciderea neputând fi realizată la distanţă); b) activarea mecanismelor litice; c) lansarea loviturii letale şi d) desprinderea de ţinta ucisă.

Se pare că numai prima fază, cea a contactului intim dintre celule este specifică, celelalte fiind procese nespecifice. Activarea precursorului *Tc* implică existenţa stimulului antigenic la care să fie asociate semnale trimise de limfocite *Th* fie prin contact direct, fie prin mediatori solubili sub restricţia antigenelor MHC. Deci, ca şi în cazul limfocitelor *B*, pentru a-şi exercita activitatea, celulele *Tc* solicită intervenţia reglatoare a limfocitelor *Th* şi *Ts* precum şi alte forme de cooperare celulară.

În infecţiile virale, anticorpii sunt importanţi deoarece neutralizează virionii care se află extracelular, adică atunci când părăsesc celula infectată şi pleacă spre alta normală pentru a o infecta. Odată ajunşi intracelular, ei nu mai pot fi "văzuţi" de anticorpi, de acum încolo rolul major în apărare revenind limfocitelor *Tc*. Acestea recunosc proteina virală inserată în membrana celulei gazdă pe care o ucid, punând în imposibilitate multiplicarea şi, implicit, difuzarea lor în organism. Aşa se explică de ce limfocitele *Tc* au rol benefic în infecţiile cu virusul Epstein - Barr, cu virusul citomegalic, în hepatitele virale, pneumopatii etc.

**Limfocitele T de hipersensibilitate de tip întârziat ($T_D$).** Celulele care pot transfera starea de hipersensibilitate de tip întârziat de la un subiect la altul sunt limfocitele $T_D$ care, o dată ce au fost sensibilizate la un antigen, produc reacţii, cunoscute sub denumirea de "tip întârziat" datorită în principal capacităţii lor de a recruta alte tipuri de celule la locul reacţiei faţă de antigenul respectiv. Ele sunt lipsite de antigene MHC, solicită aportul limfocitelor *Th*, iar după contactul cu antigenul, eliberează limfokine care atrag macrofagele şi alte celule care vor amplifica reacţia locală.

## CLASA LIMFOCITELOR *B*

Derivă din celulele educate în măduva osoasă la mamifere sau bursa lui Fabricius la păsări. Caracteristica lor majoră o constituie natura imunoglobulinică a receptorilor pentru antigen în cazul celulelor virgine sau de memorie şi secreţia imunoglobulinelor cu funcţie de anticorpi în cazul celulelor efectoare (plasmocitelor). Diferenţierea limfocitelor *B* în cursul evoluţiei de la progenitor până la plasmocit este controlată, ca şi în cazul limfocitelor *T*, de factori independenţi de stimulul antigenic, care conduc precursorul până la stadiul de celulă imunocompetentă, după care intervine antigenul care va orienta celula spre plasmocitul efector.

Precursorii derivă din hemocitoblast; aflaţi la periferia măduvei osoase migrează spre centrul ei, unde exprimă molecule de adeziune şi vin în contact cu

reţeaua de celule dendritice reticulare. Aici, dintr-un precursor derivă cca. 64 de progenitori, dintre care vor supravieţui numai cei care-şi rearanjează eficient linia germinativă şi care se acumulează în spaţiile sinusoidale, aproape de sinusul central de unde trec în circulaţie ca celule virgine (fig. 52). Marea lor majoritate mor (la oaie peste 95%) fiind rapid fagocitate.

La nivelul măduvei, precursorii sunt supuşi primei selecţii la care rezistă un număr redus, care sintetizează intracitoplasmatic lanţul $\mu$ şi apoi $L$, ulterior lanţul $\delta$ şi care, în final, exprimă receptorii IgM şi IgD (vezi "Receptorii de membrană pentru antigen"). Ajung în circulaţie ca celule virgine, sunt supuşi la o a doua selecţie, majoritatea lor având viaţă scurtă, fiind omorâţi şi depozitaţi în splină. Precursorii $\mu^+$ şi $\delta^+$ care au rezistat ajung în ariile $B$ -dependente din ganglioni şi splină unde trăiesc 6-8 săptămâni după care, dacă nu întâlnesc antigenul, mor, fiind înlocuiţi cu alte celule virgine şi imunocompetente. Dacă întâlnesc antigenul pentru care au receptori, celulele suportă cea de a treia selecţie în care au loc hipermutaţii somatice cu evoluţie spre plasmocite şi celule de memorie.

După unii, pentru a se menţine, celulele de memorie au nevoie de stimul antigenic repetat, în caz contrar, fiind înlăturate din organism în decurs de 10 zile. Deci, nu ar fi celule "cu viaţă lungă". Alţii susţin că ar fi totuşi celule cu viaţă lungă şi că nu s-ar regenera prin episoade activatoare realizate de antigen. Dar, nu este exclus ca aceste episoade să fie realizate de către celulele dendritice foliculare care formează o adevărată reţea la nivelul organelor limfoide secundare şi care, fixând antigenul, ar putea genera un stimul cronic.

Celulele care evoluează spre plasmocit încep să-şi dezvolte maşinăria de sinteză a anticorpilor: îşi pierd receptorii de membrană, îşi dezvoltă reticulul endoplasmic şi aparatul Golgi care este implicat în glicozilarea imunoglobulinelor, creşte numărul poliribozomilor liberi din citoplasmă etc. Celula devine "plasmocit" secretor, caracterizat printr-un reticul endoplasmic bogat, dispus sub formă de canale paralele care se dilată ca nişte "cisterne" atunci când sunt pline cu molecule

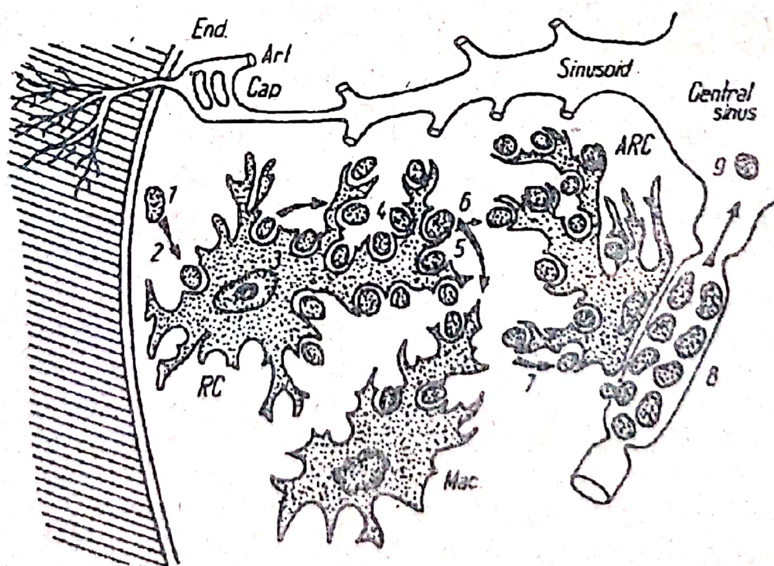



Fig.52. Schema genezei limfocitelor $B$. Precursorii limfocitari $B$ se diferenţiază în secvenţele numerotate de la 1 la 8, după care părăsesc organul limfoid central prin sinusul central (9). ARC=celulă reticulată adventicială; Art=arteriolă; Cap=capilar; Mac=macrofage; End=endoperiost (după R.B. Gallagher şi D.G. Osmond).

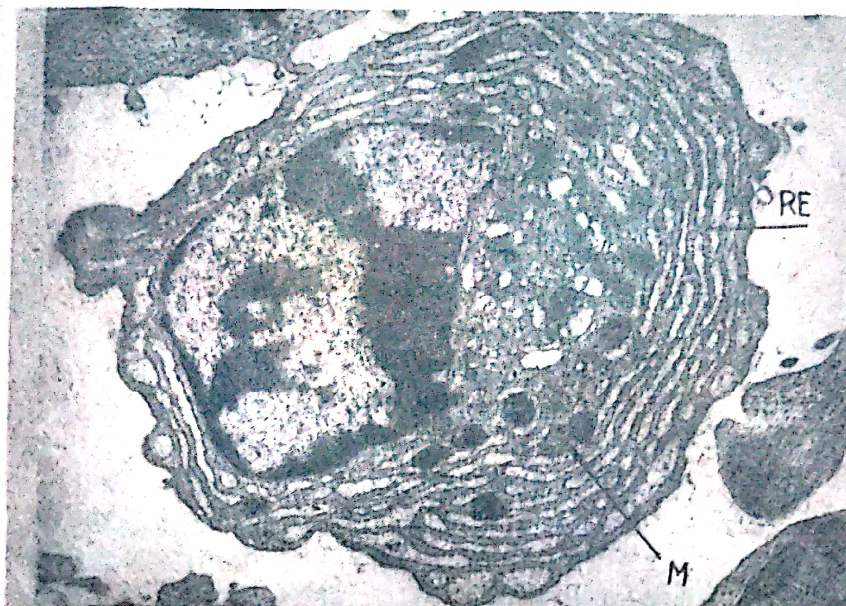



Fig.53. Imaginea unui plasmocit. Se observă numeroase mitocondrii (M) şi cisterne ale reticulului endoplasmic (RE) puternic dezvoltate (microscopie electronică, transmisie directă, 10 800 x).

de imunoglobulină (fig. 53). Un plasmocit sintetizează o singură clasă de Ig, în populaţia limfoidă existînd subpopulaţii de celule *B* care vor sintetiza diferite clase de anticorpi. Prin tehnica "plajelor hemolitice" celula secretoare poate fi identificată *in vitro*, deoarece atunci când este stimulată cu hematii de oaie secretă anticorpi care se fixează pe eritrocitele din mediu şi care, în prezenţa complementului sunt lizate, zona apărând clară, transparentă (fig. 54).

În afară de funcţiile secretorii, a fost semnalată existenţa limfocitelor *B* supresoare şi cea a limfocitelor *B* care prezintă antigenul limfocitelor *T*, cu referire specială a moleculelor care nu sunt internalizate şi prelucrate de către celulele *B* cu funcţie APC.

Deci, limfocitele *B* pot interveni în procesele de reglare a răspunsului imun.

Distribuţia lor în organele limfoide este diferită şi întrucâtva opusă distribuţiei limfocitelor *T*, în sensul că, în organul în care populaţia *T* este mai săracă, predomină populaţia *B* şi invers (tabelul 33).

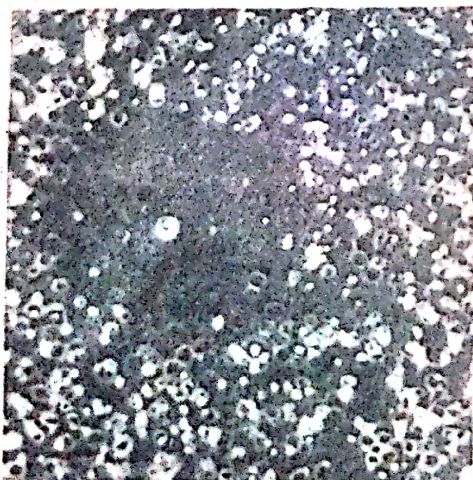


Fig.54. Imaginea la microscopul fotonic a unei "plaje hemolitice". În centrul zonei clare de hemoliză este un plasmocit - formaţiunea de culoare albă - care a secretat anticorpi antihematie de oaie. Anticorpii au difuzat în mediu, s-au fixat specific pe hamatiile înglobate într-un strat de agar moale şi, după acoperirea plăcii cu ser normal de cobai ca sursă de complement, le-au lizat.

*Tabelul 33*

**Distribuţia limfocitelor T şi B în diferite organe limfoide şi în sângele periferic**

| Organul limfoid | Celule prezente % | |
|---|---|---|
| | *T* | *B* |
| Timus | 100 | 0 |
| Măduva osoasă | 0 | 100 |
| Canal toracic | 80 - 90 | 4 - 10 |
| Ganglioni limfatici | 60 - 80 | 20 - 35 |
| Splină | 30 - 50 | 50 - 60 |
| Plăci Peyer | 30 - 35 | 60 - 70 |
| Sânge periferic | 60 - 80 | 5 - 20 |

CELULELE *NK*

*Celulele NK* ucid fără restricţie MHC celule tumorale, în special cele de origine medulară (leucemice), celule infectate viral sau bacterian şi chiar bacterii izolate. Reprezintă o linie importantă şi primordială de apărare a organismului, pe care-l ajută să rejecteze celulele modificate sau chiar alogrefele, cu rol reglator asupra celulelor hematopoietice în general şi a limfocitelor *B* în special. Secretă diferite limfokine, mai ales după stimularea cu imunomodulatori care controlează creşterea şi diferenţierea limfocitelor *B* şi a altor populaţii limfocitare, contribuind la eliminarea precursorilor celulari inutili.

Sunt celule cu viaţă scurtă, rapid înlocuite cu altele nou formate, prezente în circulaţie şi în organele limfoide ale mamiferelor, aparţinând la o subpopulaţie limfocitară distinctă numită LGL (celule granulare mari="large granular lymphocytes") a căror caracteristică morfologică principală este existenţa granulelor azurofile citoplasmatice. Celulele acestei populaţii nu aderă la suprafeţe, au receptori *Fcγ* dar nu au receptori pentru complement şi nu au imunoglobuline de suprafaţă. Dar nu toate celulele LGL sunt celule *NK*, acestea din urmă având unele caractere antigenice de membrană proprii atât celor descendente din seria mieloidă cât şi celor din seria limfoidă. De exemplu, celulele *NK* umane exprimă pe suprafaţa lor unii markeri antigenici caracteristici celulelor LGL (*CD*3-LGL), limfocitelor *T* (*CD*2;*CD*8) şi mielomonocitelor (*CD* 11). În consecinţă, este posibil ca populaţia *NK* să derive din linia limfocitară *T*, ipoteza fiind susţinută de caracterele fenotipice şi funcţionale, specifice celulelor *T* (markeri *CD*2, *CD*4, capacitatea de a forma rozete E, de a produce IL-2 etc.) dar, la fel de bine este posibil să derive din seria mieloidă; au markerul *CD*11, secretă IL-1 şi TNF secretate şi de celulele mieloide etc.

În orice caz, aşa după cum rezultă şi din tabelul 34, există asemănări şi deosebiri în ce priveşte exprimarea unor antigene pe membrana plasmatică a celulelor *NK* şi *T*, tinere sau mature funcţional. Probabil că la aceste două populaţii celulare intervin unele mecanisme diferite care le controlează unele funcţii sau

exprimarea unor antigene. De exemplu, celulele *T* tinere sau adulte exprimă bine lanţurile $\gamma\,\delta$ şi $\varepsilon$ ale CD3. La *NK*, aceste lanţuri lipsesc deşi transcrierea sintezei lor este prezentă, de unde concluzia că aceste celule sunt incapabile să le rearanjeze într-o manieră funcţională. Aşa se explică de ce lanţurile $\gamma$, $\delta$, $\varepsilon$, există intracitoplasmatic la *NK* tinere, dar nu se regăsesc la celule adulte.

*Tabelul 34*

**Antigene exprimate pe membrana celulelor NK şi T**
**(după L.L. Lanier şi col.)**

| Antigenul | *NK* | | *T* | |
|---|---|---|---|---|
| | Fetale | Adulte | Fetale | Adulte |
| *CD*1 | - | - | + | - |
| *CD*2 | + | + | + | + |
| *CD*3 $\gamma,\delta,\varepsilon$ | + | - | + | + |
| m*CD*3 $\gamma,\delta,\varepsilon$ | - | - | + | + |
| TCR | - | - | + | + |
| *CD*4 | - | - | + | + |
| *CD*5 | - | - | + | + |
| *CD*7 | + | + | + | + |
| *CD*11a/*CD*18 | + | + | + | + |
| *CD*11b/*CD*18 | + | + | - | + |
| *CD*16(Fc$\gamma$RIII) | + | + | - | + |
| *CD*29 | + | + | + | + |
| *CD*38 | + | + | + | + |
| *CD*44 | + | + | + | + |
| *CD*45RA | + | + | + | + |
| *CD*45RO | - | - | + | + |
| *CD*56 | + | + | - | + |
| *CD*57 | - | + | - | + |
| LECAM-1 | + | + | + | + |

m*CD*3=marker exprimat pe membrana citoplasmatică; TCR=receptor pentru antigen exprimat pe limfocitele *T* şi specific acestora.

Prin secreţia unor citokine, celulele *NK* reglează hematopoieza şi asigură protecţie timpurie a organismului deoarece, în ontogenie, ele se dezvoltă înaintea limfocitelor *T*. Faptul că sunt prezente la şoarecii atimici *Nu*/*Nu* demonstrează că aceste celule se maturează independent de timus, deşi sunt prezente în acest organ într-o proporţie foarte redusă (0,1%).

Populaţia *NK* recunoaşte şi leagă spontan ţinta (fig. 55) pe care o ucide în câteva ore, deosebindu-se din acest punct de vedere de limfocitele *Tc*, cu toate că ambele realizează procesul litic parcurgând aceleaşi etape: a) recunoaşterea

şi "legarea" ţintei; b) activarea mecanismelor litice; c) lansarea loviturii litice şi d) desprinderea de pe celula ţintă.

Deşi celulele *T* şi *NK* mature sunt populaţii distincte, se pare că totuşi ar avea un progenitor comun, descendenţii din acesta, în stadiile ulterioare de diferenţiere evoluând fie spre celule *NK*, fie spre limfocitele *T* (fig. 56). Celulele *NK* la fetus sunt prezente în ficatul embrionar, de unde ajung în circulaţie, unde reprezintă 1-5% din totalul limfocitelor. Se găsesc în majoritatea ţesuturilor şi organelor, dar au o distribuţie diferită de cea a limfocitelor *T* şi monocitelor (tabelul 35).

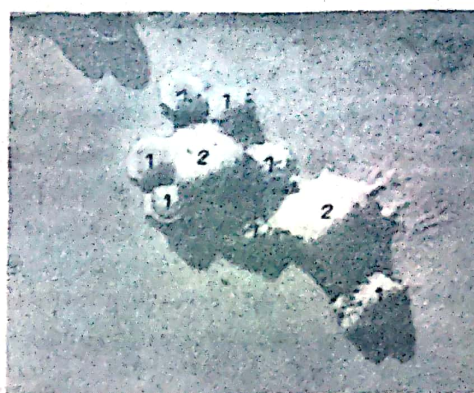



Fig.55. Celule NK umane (1) recunoscând şi ataşându-se la celule eritroleucemice umane din linia $K_{562}$ (2), în vederea uciderii lor

*Tabelul 35*

**Prezenţa celulelor NK, limfocitelor T şi monocitelor (M) în circulaţie şi în diferite organe limfoide**

| Organul | Celule | | |
|---|---|---|---|
| | *NK* | *T* | *M* |
| Sânge | +++ | +++ | +++ |
| Timus | - | +++ | - |
| Măduva osoasă | ± | - | +++ |
| Canal toracic | - | +++ | - |
| Ganglioni limfatici | ± | +++ | + |
| Splină | +++ | +++ | +++ |

Notă: +++; ++=bine exprimat; +- =foarte slab exprimat; – =absent

Existenţa şi nivelul funcţiilor *NK* sunt influenţate de o serie de factori, cum ar fi determinismul genetic, vârsta, imunoglobulinele, unele citokine, medicamente, alimente, boli, stres etc. (fig. 57). Vârsta influenţează existenţa acestui tip de celule, la oamenii bătrâni activitatea lor putând fi mai scăzută comparativ cu cea de la adulţi. La şoarece, apar la 4-5 săptămâni după naştere şi dispar la cca. 12-16 luni. Determinismul genetic este evident. De exemplu, unele tulpini de şoarece (*Nu/Nu*; *CBA*; $C_3H$; $C_{57}$ Bl) au o activitate crescută, altele însă, au această activitate foarte scăzută (*A*; *L*; *CA*; *S7*; Beige). La om, unii subiecţi au o activitate *NK* constant ridicată, alţii constant scăzută iar alţii oscilantă: uneori nivelul acestei funcţii este crescut, alteori, scăzut (tabelul 36). Unii au emis ipoteza că recunoaşterea celulelor alogene de către efectoarele *NK* este condiţionată de exprimarea pe suprafaţa lor a moleculelor complexului major de histocompatibilitate (MHC) de clasa I (vezi capitolul "Complexul Major de Histocompatibilitate"). O reducere a exprimării lor, ca urmare a mutaţiilor survenite datorită infecţiilor virale sau unor factori fizico-chimici, ar face celulele susceptibile la liza *NK*. Dimpotrivă, o activare a exprimării acestor molecule ar conferi rezistenţă celulelor ţintă. Ipoteza, deşi atrăgătoare, nu a fost confir-mată experimental până în prezent.

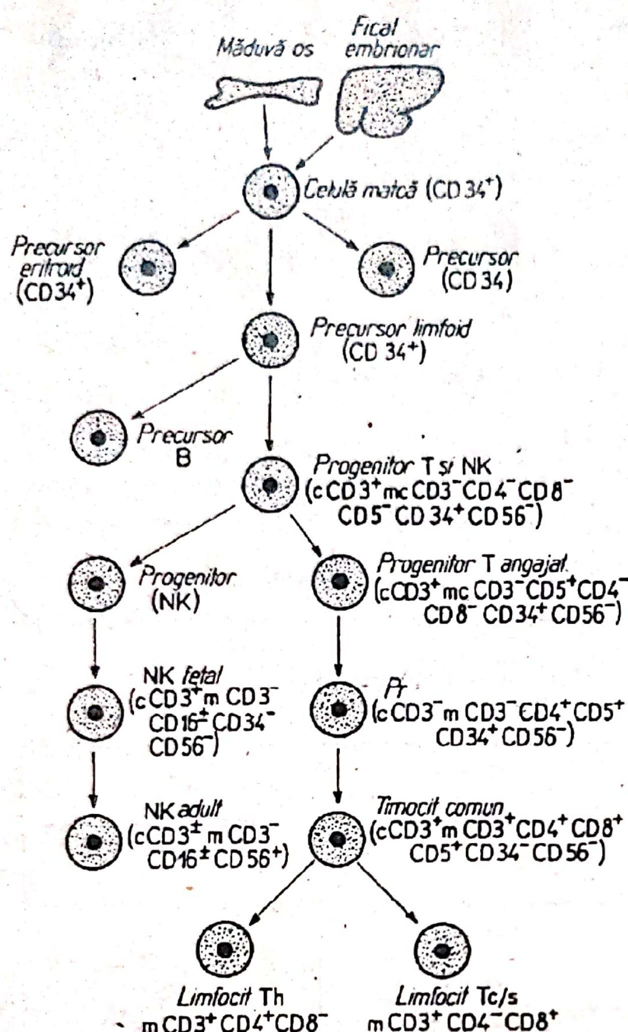



Fig.56. Ipoteză privind descendenţa celulelor *NK*. Din măduva osoasă sau ficatul embrionar se generează celula matcă, din care vor descinde precursorii limfoizi B şi cei limfoizi T. Din linia T se vor detaşa precursorii NK. Atât descendenţii *T* cât şi cei *NK* vor prezenta "modulaţii antigenice" pe tot cursul maturării lor.

Acest determinism genetic poate fi influenţat de o serie de factori sau boli, în special de cele neoplazice. Prostaglandinele, corticosteroizii, radiaţiile, histamina, teofilina, diverşi mediatori care stimulează producţia cAMP şi a prostaglandinelor inhibă activitatea *NK*. Alţii, ca de pildă IL-2, interferonii, Poli I:C, acidul retinoic, diverşi imunomodulatori de genul BCG, Cantastim etc. activează funcţiile citotoxice nespecifice. De fapt, mulţi agenţi biologici au rol reglator asupra acestor funcţii. Este cazul imunoglobulinelor sau al prostaglandinelor, în special al $PGE_2$ care activează maturarea precursorilor *NK*. În unele situaţii, efectul asupra celulelor *NK in vitro* este aparent, putând genera confuzii. De exemplu, se susţine că proteina *A* stafilococică (*SpA*) activează funcţiile litice ale acestor celule dar, în realitate, această activare este dată nu de *SpA* ci de unele impurificări ale acestui preparat.

Recunoaşterea ţintei ar fi mediată de diverse molecule ca laminina, CD2, CD16, şi LFA-1, deşi nici una dintre acestea nu este exclusiv asociată cu NK. Se pare că rolul important din acest punct de vedere ar reveni unei proteine de 80 kD cu funcţie de receptor pentru liganzii de pe ţintă. Este posibil ca efectele antitumorale *in vivo* să fie indirecte, celulele *NK* fiind activate de citokine imuno-reglatoare care

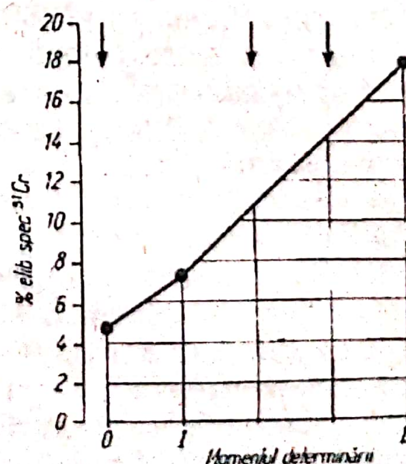



Fig.57. Funcţiile citotoxice ale celulelor NK din sângele unui pacient cu LLCT, consecutiv terapiei cu Cantastim (săgeţile), evaluate *in vitro*. Celulele ţintă folosite au fost din linia $K_{562}$ marcate radioactiv cu $^{51}$Cr. Activitatea citotoxică a fost exprimată ca procent de eliberare specifică a izotopului.

*Tabelul 36*

**Eliberarea specifică a $^{51}Cr$ din celulele țintă $K_{562}$ sub acțiunea celulelor NK la diferiți subiecți, determinată la interval de 4-5 luni**

| Subiect nr. | Testarea nr. | | | Activitatea NK |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | |
| 1 | 2,50 | 3,42 | 2,31 | Scăzută |
| 2 | 6,30 | 0,00 | 4,30 | " |
| 3 | 14,40 | 8,08 | 9,80 | " |
| 4 | 16,40 | 12,60 | 11,60 | " |
| 5 | 50,00 | 30,00 | 54,00 | Crescută |
| 6 | 31,00 | 62,00 | 48,00 | " |
| 7 | 45,20 | 46,30 | 39,20 | " |
| 8 | 47,00 | 42,00 | 60,00 | " |
| 9 | 71,00 | 27,00 | 8,00 | Variabilă |
| 10 | 5,60 | 18,00 | 50,00 | " |
| 11 | 13,00 | 35,00 | 4,00 | " |
| 12 | 0,00 | 9,80 | 36,20 | " |

pot contribui nu numai la menţinerea homeostaziei funcţiilor imune, dar şi la distrugerea nespecifică, dar selectivă a celulelor tumorale.

## CELULELE *K*

Celulele care au receptori *Fc* pot liza ţintele care au fixat pe suprafaţa lor molecule de anticorp, realizând citotoxicitatea mediată celular dependentă de anticorp sau ADCC (ADCC=antibody dependent cellular cytotoxicity). Prin receptorul *Fc*, celula efectoare fixează fragmentul *Fc* al moleculei de anticorp fixată prin *Fab* la suprafaţa celulei ţintă, fixare care condiţionează declanşarea mecanismelor ei litice.

Deci, în citotoxicitatea ADCC, celula efectoare ucide nespecific orice ţintă care a fost recunoscută specific de către moleculele de anticorpi (fig. 58). Efectoarele acestei citotoxicităţi sunt denumite generic celule *K* ("killer"=ucigaşe). Ar fi celule *NK*, monocite, promonocite sau chiar o linie aparte de celule, derivate din măduva

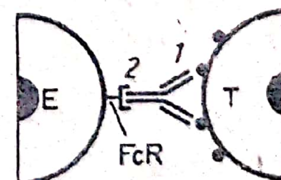



Fig.58. Mecanismul de acţiune a limfocitelor *K* în citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă (ADCC). Celula ucigaşă (E) se fixează la celula ţintă (T) prin intermediul receptorului *FcR* pentru fragmentul *Fc* (2) al moleculei de anticorp (1) care s-a fixat specific pe antigenele de la suprafaţa ţintei.



8 – Imunologie – cd. 114



osoasă. Ele pot recunoaşte ca ţintă hematiile, fibroblastele, limfocitele normale sau deviate neoplazic etc. Pentru realizarea lizei, sunt suficiente cca. 100 de molecule IgG pentru o singură celulă ţintă, excesul de anticorpi inhibând procesul litic. Acest fapt subliniază importanţa citotoxicităţii ADCC în apărarea organismului. Intervine în momentele timpurii ale agresiunii când abia începe sinteza anticorpilor şi comutarea de la IgM la IgG. O parte din celule se fixează specific pe ţintă, iar celulele *K* la *Fc*, activându-şi mecanismele litice.

Mai târziu, când titrul anticorpilor creşte, această activitate este inhibată fiind înlocuită de alte mecanisme de apărare (citotoxicitate mediată de celulele *Tc*, de complement etc.).

Unii autori afirmă că celulele *K* şi *NK* ar fi identice, argumentul principal adus în sprijinul acestei afirmaţii fiind existenţa pe ambele celule a receptorului *Fc*. Dar, experimentele pe purceii nou-născuţi au demonstrat că populaţia *K* apare mai timpuriu decât cea *NK* şi că au alt mod de distribuire în organe. La om, în unele deficite imune, funcţiile *NK* sunt inhibate sau chiar anulate, pe când cele *K* rămân neinfluenţate. De asemenea, PHA, interferonii activează funcţiile *NK* dar nu ADCC, pe când pronaza, în anumite concentraţii, inhibă *NK* dar nu ADCC. Toate acestea dovedesc că efectoarele acestor două modalităţi diferite de citotoxicitate, cel puţin din punct de vedere funcţional, reprezintă entităţi diferite.

Ca şi citotoxicitatea *NK*, funcţia ADCC este influenţată negativ sau pozitiv de către diverşi factori, ca de pildă de către fragmentele complementului, unele citostatice cum ar fi ciclofosfamida, clasa moleculelor de anticorp fixate pe ţintă, numărul lor etc. În orice caz, această funcţie este mai "robustă" decât altele, utilizarea ei ca test imunologic având o valoare diagnostică şi prognostică modestă.

## CELULELE *LAK*

*Celulele LAK* ("lymphokine activated killer"=ucigaşe activate de limfokine) sunt efectori citotoxici activaţi de către IL-2 sau IFN $\alpha$. Limfocitele din sângele periferic, de exemplu, cultivate *in vitro* în prezenţa IL-2 şi a antigenului tumoral, devin intens citotoxice faţă de tumorile respective. Unii autori susţin că progenitorii acestora sunt multipli, deci populaţia *LAK* ar fi formată din diferite linii celulare care însă formează un "sistem funcţional unic". Alţii consideră că precursorii lor sunt unici şi diferiţi de precursorii celulelor *NK* sau ai limfocitelor *Tc*.

Există asemănări morfologice între *LAK* şi *NK*, cel puţin o parte din efectele antitumorale mediate de *NK* fiind probabil realizate consecutiv producerii şi eliberării de citokine, şi în special de IL-2 care este un potent stimulator al lor. Dar, pentru a se putea stabili cu certitudine existenţa unor deosebiri între *NK* şi *LAK*, ar trebui să se realizeze o depleţie a celulelor *NK* prin liza selectivă cu anticorpi selectivi şi să se determine apoi dacă celulele neafectate de anticorpii anti-*NK* mai pot sau nu acţiona citolitic sub acţiunea IL-2.

# • EFECTORII UMORALI AI IMUNITĂŢII

## IMUNOGLOBULINE: STRUCTURĂ ŞI FUNCŢII

### DEFINIŢIE. NOŢIUNI GENERALE

Imunoglobulinele (Ig) sunt un grup de proteine înrudite, cu funcţii de anticorp, care există sub formă de molecule libere sau de receptori de membrană pentru antigen de pe suprafaţa limfocitelor *B*, efectoare ale răspunsului imun mediat umoral. Ele migrează electroforetic, în mare parte în zona gammaglobulinelor şi mai puţin în cea a betaglobulinelor (fig. 59, 60, 61). Sinteza lor este realizată de

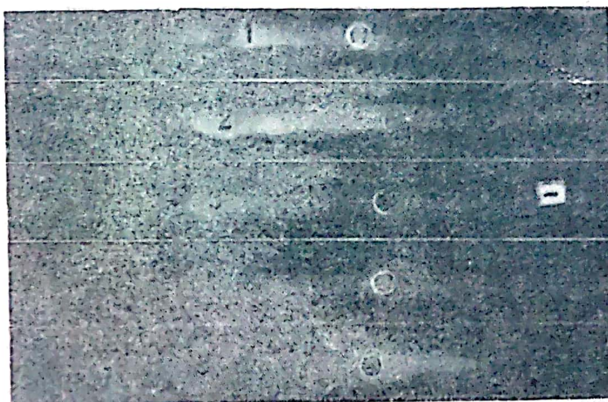


Fig.59. Migrarea în câmp electric a globulinelor serice de şoarece. În cele 5 godeuri de pe placa acoperită cu gel de agar în tampon-veronal au fost introduse seruri recoltate de la embrioni de şoarece (1), pui nou-născuţi (2), sugari de diferite vârste (3,4) şi adulţi (5). Spre anod (+) au migrat albumina, $\alpha$- şi $\beta$-globulinele, iar spre catod (–) imunoglobulinele. Se observă absenţa acestora în serul embrionilor şi al nou-născuţilor (1,2) şi valorile lor reduse la sugari (3,4). La adult (5), prezenţa lor este evidentă.

către limfocitele *B* ajunse în faza de maturare finală (plasmocit). Se găsesc în plasmă, în lichidele extravasculare şi în diferite secreţii exocrine. O parte din molecule se fixează citofil pe receptorii pentru *Fc* de pe membrana macrofagelor, limfocitelor *B*, granulocitelor PMN, mastocitelor, bazofilelor etc.

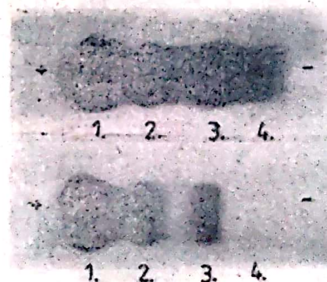



Fig.60. Migrarea globulinelor serice de şoarece în câmp electric. Sus: ser de şoarece adult. Jos: ser de embrion. 1 = albumină; 2 = $\alpha$-globuline; 3 = $\beta$-globuline; 4-gammaglobuline (absente la embrion).

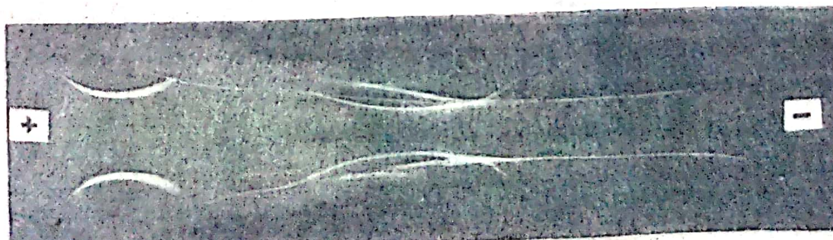



Fig.61. Liniile de precipitare ale globulinelor serice umane, în imunoelectroforeza în gel de agar. Spre anod (+) sunt liniile date de albumină, $\alpha$- şi $\beta$-globuline iar spre catod (–) cele ale imunoglobulinelor.

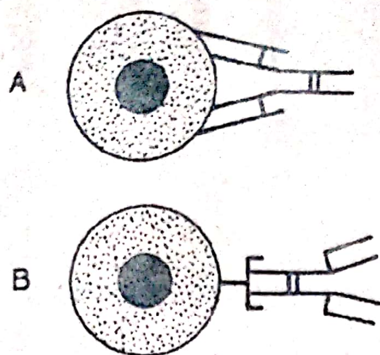



Fig.62. Fixarea specifică (A) şi citofilă (B) a unei molecule de imunoglobulină pe suprafaţa unei celule.

În organism pot exista ca: a) molecule libere, răspândite în plasmă şi în alte lichide ale corpului; b) sub formă de complexe antigen+anticorp; c) molecule fixate citofil la diferite celule sau ţesuturi (fixate prin fragmentul *Fc* de la extremitatea COOH a moleculei şi nu specific, prin situsul combinativ de la extremitatea $NH_2$ terminală); d) molecule fixate în membrana plasmatică a limfocitelor *B*, cu rol de receptori pentru antigen (fig. 62).

În componenţa lor se găsesc cei cca. 20 de aminoacizi esenţiali care intră în alcătuirea oricărei molecule de proteină, dar structura lor specifică este determinată de secvenţa aminoacizilor în lanţul polipeptidic primar. Ig se deosebesc de globulinele serice normale prin capacitatea de reacţie specifică cu antigenul care le-a determinat sinteza, prin sensibilitatea la unele enzime de genul pepsinei şi tripsinei, prin constanta de sedimentare, viscozitate etc. Moleculele de Ig fixează complementul, activează fagocitoza prin mecanisme aşa-zise "opsonice" şi pot străbate diferite bariere ale organismului. Ele au caractere antigenice proprii, împărţindu-se în clase, subclase şi diferite alte subtipuri antigenice.

## STRUCTURA IMUNOGLOBULINELOR

A fost descifrată datorită lucrărilor de pionierat ale lui R. PORTER şi G. EDELMAN care au scindat prin proteoliză enzimatică molecula în lanţuri şi în fragmente care au putut fi apoi studiate biochimic şi funcţional (fig. 63).

R. PORTER (1959), prelucrând molecula prin tratament enzimatic cu papaină, obţine trei fragmente, dintre care două legau antigenul, din care cauză au fost denumite fragmente *Fab* (Fragment antigen binding, sau fragment care leagă

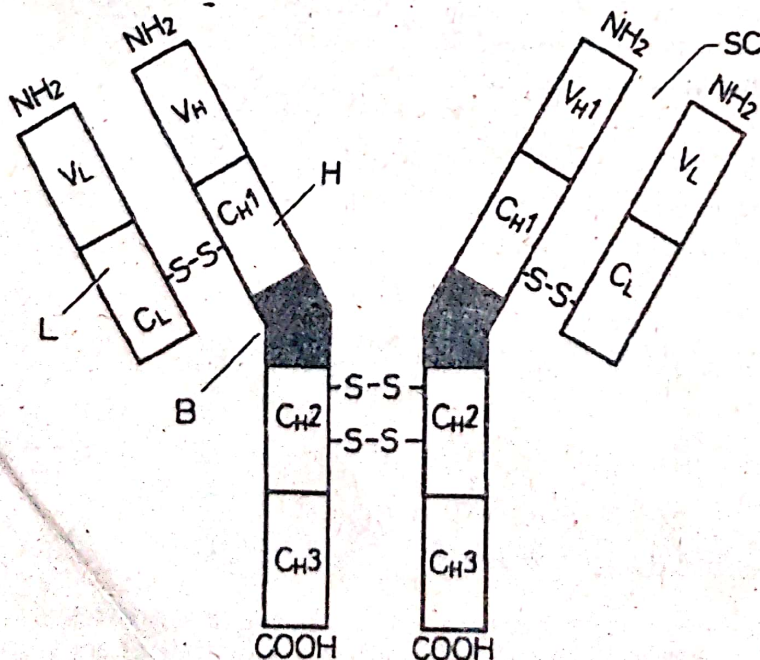



Fig.63. Structura moleculei de imunoglobulină. Molecula este un dimer cu două lanţuri lungi (*H*) şi două lanţuri scurte (*L*) legate între ele prin legături disulfidice (-S-S). Poziţia reziduurilor de aminoacizi în lanţurile lungi şi scurte este variabilă spre extremităţile $NH_2$ terminale unde se formează domeniile variabile $V_L$ şi $V_H$. Către extremităţile COOH terminale, este tot mai constantă, formând domeniile $C_L$ şi $C_H1$, $C_H2$ etc. Domeniile $V_L$ şi $V_H$ alcătuiesc situsul combinativ (SC) la nivelul căruia este recunoscut şi fixat specific epitopul. Între domeniile $C_H1$ şi $C_H2$ este "regiunea balama" (B).

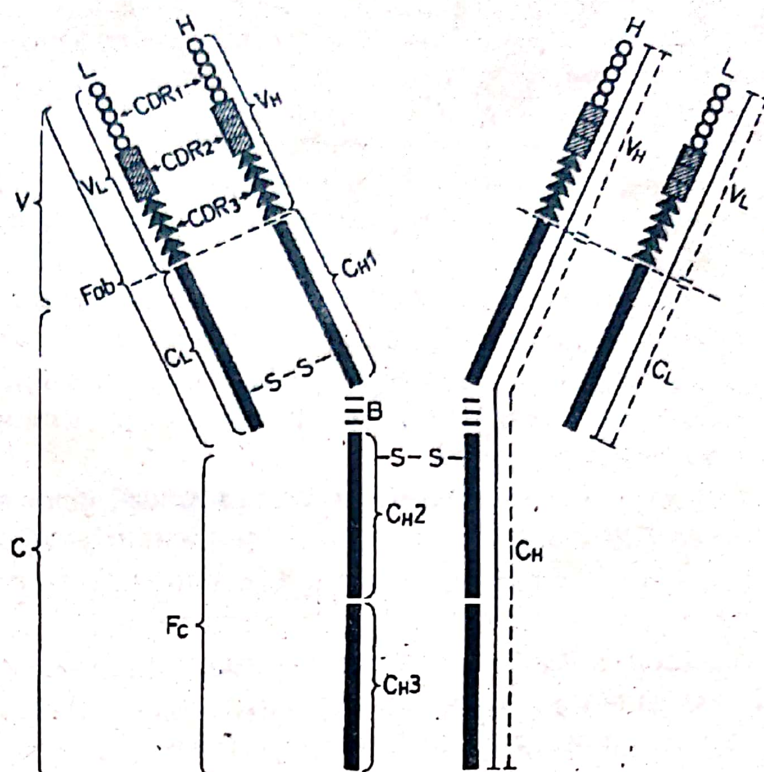



Fig.64. Papaina scindează molecula de imunoglobulină la nivelul reziduurilor de His-Tr aflate înaintea dublelor legături -S-S- ale lanţurilor *H*, în două fragmente *Fab* formate din domeniile $V_L$, $V_H$, $C_L$, şi $C_H{}^1$ şi un fragment *Fc* format din $C_H{}^2$ şi $C_H{}^3$.

antigenul) şi unul care cristaliza, fiind denumit fragment *Fc* (fragment cristalizabil) (fig. 64). Fiecare fragment *Fab* are greutatea moleculară de cca. 45 kD, leagă antigenul monovalent cu care însă nu formează aglutinate sau precipitate vizibile. Fragmentul *Fc* are greutatea moleculară de cca. 55 kD, poate fixa complementul şi se poate lega citofil la receptorii pentru *Fc* de pe membrana diferitelor celule.

Prin digestia cu pepsină, s-a obţinut un fragment bivalent, adică cele două fragmente *Fab* unite între ele dar fără fragmentul *Fc,* din care cauză a fost denumit fragmentul *F(ab')*2. Are greutatea moleculară de cca. 100 kD şi participă în calitate de anticorp complet la reacţiile de aglutinare şi precipitare (fig. 65).

G. EDELMAN (1959), reducând prin 2-mercaptoetanol legăturile disulfidice ale moleculei, a izolat patru lanţuri polipeptidice. Molecula de Ig, în prezenţa 2- mercaptoetanolului dizolvat într-o soluţie concentrată de uree, s-a desfăcut în părţile sale componente, respectiv în cele patru lanţuri, dintre care două mai grele, cu greutate moleculară de 50-60 kD denumite *H* (heavy = greu) şi două mai uşoare, cu greutate moleculară de 20-25 kD denumite *L*, de la termenul englezesc light care înseamnă uşor. Singure, nici unul dintre aceste lanţuri polipeptidice nu poate lega antigenul, fiind necesară unirea lor două câte două, adică unirea unui lanţ *L* cu un lanţ *H* pentru a forma locul de unire cu antigenul. Deci, fiecare moleculă de Ig este formată din cel puţin o unitate monomerică de bază care conţine patru

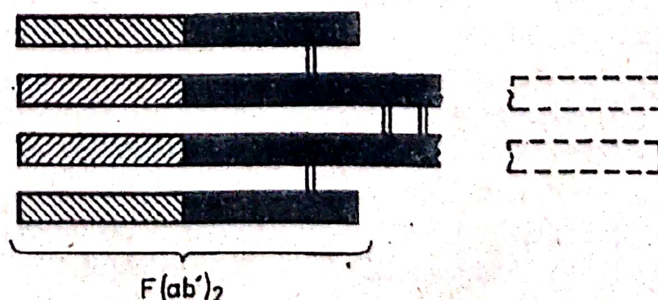



Fig.65. Pepsina scindează molecula de imunoglobulină la nivelul reziduului Leu aflat după dublele legături -S-S- ale lanţurilor *H*. Rezultă un fragment mare *F(ab')*2.

lanţuri polipeptidice: două $L$ şi două $H$, unite între ele prin punţi disulfidice (-S-S-). Aceste punţi se formează la nivelul reziduurilor de cisteină şi pot fi în interiorul lanţului sau "intracatenar", şi între lanţuri diferite sau "intercatenar". Ele sunt esenţiale pentru asigurarea structurii tridimensionale a moleculei şi pentru realizarea condiţiilor de funcţionalitate a ei.

Lanţurile $L$ sunt comune pentru toate clasele de imunoglobuline, din punct de vedere antigenic putând aparţine la două tipuri distincte: de tip k *(kappa)* şi de tip $\lambda$ (lambda). În molecula de Ig ambele lanţuri aparţin în mod obligatoriu aceluiaşi tip, adică sunt k sau $\lambda$. Aproximativ 60% dintre oameni au molecule de Ig cu lanţuri $L_k$ dar această proporţie poate varia în funcţie de o serie de factori ca de pildă gradul de imunizare, antigenul imunizant, diferite stări patologice etc. La şoareci, moleculele cu lanţurile $L_k$ reprezintă doar 5% din populaţia de Ig, predominante fiind cele cu lanţuri $L\lambda$.

Lanţurile $H$ se deosebesc prin proprietăţile lor antigenice, ele conferind caracterul de "clasă" imunoglobulinelor; lanţul greu al moleculelor IgM se numeşte $\mu$ *(miu)*, al celor IgG $\gamma$ *(gamma)*, IgA- $\alpha$ *(alfa)*, IgE- $\varepsilon$ *(epsilon)* şi IgD- $\delta$ *(delta)*. Analiza structurală şi chimică a lanţurilor moleculei de Ig s-a realizat folosind populaţii moleculare foarte omogene, obţinute de la pacienţi cu mielom plasmocitar. În această stare patologică este o sinteză exagerată de molecule aparţinând unei clase normale de Ig. Pot fi şi situaţii în care sinteza exagerată să producă "molecule patologice" de imunoglobulină sau chiar numai lanţuri $L$ sau $H$. Este cazul proteinelor Bence-Jones, nişte dimeri de lanţuri $L_k$ sau $L\lambda$ sau al "lanţurilor grele patologice" în care lipsesc aminoacizii care formează segmentul $C_H1$. Lanţurile $L$ au cca. 214 reziduuri de aminoacizi şi greutatea moleculară 25 kD, fiind compuse dintr-o regiune variabilă ($V_L$) şi una constantă ($C_L$) care conţin fiecare cca. 107 reziduuri de aminoacizi. Din punct de vedere antigenic aparţin, după cum spuneam, tipurilor $L_k$ sau $L\lambda$. Lanţul $L_k$ are 214 aminoacizi, în secvenţa $V_k$ fiind 107-108 reziduuri cu importante variaţii care permit împărţirea lui în trei grupe: $V_kI$, $V_kII$ şi $V_kIII$. În regiunea $C_k$ sunt numai variaţii alotipice, determinate genetic nu şi variaţii somatice. La om, extremitatea COOH terminală are aminoacidul cisteină 214 care, în cazul lanţului $H$ al moleculei de IgG1, leagă Cys 220, pe când în cel al IgG2 pe Cys 131, fapt care condiţionează conformaţia sterică diferită a acestor două subclase de Ig. Lanţul lambda are 213-216 resturi de aminoacizi, cu cisteina situată în penultima poziţie şi nu ultima, cum este cazul la lanţul $L_k$. Extremitatea $NH_2$ terminată la $L\lambda$ este blocată de acidul pirolidoncarboxilic, o anhidridă ciclică a acidului glutamic.

Variaţiile în poziţia aminoacizilor de la nivelul regiunii $V$ permit împărţirea lor în 5 grupe antigenice diferite. De asemenea, în timp ce regiunea $C_k$ este codificată de către o genă unică şi prezintă o secvenţă aminoacidă unică, regiunea $C\lambda$, codificată de către trei gene diferite, prezintă trei secvenţe: două se datoresc permutării lizină-arginină din poziţia 190 (factorul Oz), iar a treia, permutării glicină-serină din poziţia 154 (factorul Kern) (tabelul 37). Aceste secvenţe există la toţi indivizii, fiind deci "markeri izotipici". Niciodată nu se ataşează o regiune $V_k$ la una $C\lambda$ sau invers, ci întotdeauna $V_k$ se ataşează la $C_k$ şi $V\lambda$ la $C\lambda$. De altfel, întotdeauna $C_k$ de la diferite specii de animale seamănă mai mult între ele, sunt mai omoloage decât $C_k$ cu $C\lambda$ provenite de aceeaşi specie.

**Factorii OZ şi KERN la nivelul lanţurilor L u mane**

| Caracterul | $C\lambda 1$ | | $C\lambda 2$ | | $C\lambda 3$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Kern $^-$ | Oz $^-$ | Kern $^-$ | Oz $^+$ | Kern $^+$ | Oz $^-$ |
| Poziţia aminoacidului în lanţ | 154 | 190 | 154 | 190 | 154 | 190 |
| Aminoacidul implicat | Ser | Arg | Ser | Lys | Gly | Arg |

*Structura lanţurilor H* diferă în secvenţa aminoacizilor în funcţie de clasa de Ig căreia îi aparţine molecula. Regiunea variabilă $V_H$ are o mai mare variabilitate decât cea $V_L$, asigurând astfel un potenţial sporit de recunoaştere a epitopilor. Regiunea constantă $C_H$ conferă moleculei diverse caracteristici antigenice, deoarece această regiune poate determina lungimea lanţului şi numărul de domenii, numărul şi localizarea legăturilor disulfidice (inter- sau intracatenar), poziţia şi modul de aşezare a oligozaharidelor care, la rândul lor, afectează conformaţia şi cresc solubilitatea moleculei, gradul de polimerizare a ei etc. În general, cele mai multe legături oligozaharidice sunt de tip *N-glucozidic* interesând acidul aspartic, legarea făcându-se, cel puţin în cazul lanţurilor $\mu$, în secvenţa obligatorie Asp-oligozaharid-Ser-Thr.

Lanţurile *H* diferă între ele prin secvenţa aminoacidă specifică fiecărui lanţ, care le conferă proprietăţi antigenice diferite. Cu toate acestea, s-a observat că există un oarecare grad de omologie, în aceeaşi poziţie existând, la lanţuri diferite, aceleaşi resturi de aminoacizi. Relaţia structurală devine mai evidentă când regiunile constante *C* sunt aliniate la reziduul Cys, care asigură legătura disulfidică intercatenară. Lanţurile *H* sunt de cca. două ori mai lungi decât cele *L*, conţinând cca. 450-600 reziduuri de aminoacizi, regiunea lor constantă *C* fiind de 3-4 ori mai lungă decât $C_L$. $C_H$ are 3-4 domenii alcătuite din câte 100-110 aminoacizi denumite $C_H1$, $C_H2$, $C_H3$ şi eventual, $C_H4$. Imunoglobulinele claselor IgG, IgA şi IgD au câte trei domenii, iar cele ale claselor IgM şi IgE, câte patru domenii constante, lanţurile $\mu$ şi $\varepsilon$ fiind mai lungi decât cele $\gamma$, $\delta$ şi $\alpha$. Pentru marcarea lor se folosesc următoarele simboluri: $C\gamma1$, $C\gamma2$, $C\gamma3$, pentru IgG; $C\mu1$, $C\mu2$, $C\mu3$ şi $C\mu4$ pentru IgM; $C\alpha1$, $C\alpha2$ şi $C\alpha3$ pentru IgA; $C\delta1$, $C\delta2$ şi $C\delta3$ pentru IgD; $C\varepsilon1$, $C\varepsilon2$, $C\varepsilon3$ şi $C\varepsilon4$ pentru IgE.

Lanţurile *H* şi *L* sunt legate prin legături disulfidice intercatenare (v. fig. 63), iar în ce priveşte pe cele intracatenare, lanţul *L* are două legături disulfidice, una la nivelul regiunii variabile *V* şi alta la nivelul celei constante *C*. Fiecare legătură realizează o buclă care conţine 60-70 de aminoacizi. Lanţurile *H* conţin mai multe legături disulfidice. De exemplu, lanţurile $\gamma$ au patru legături, formând domenii: lanţul *L* are două domenii realizate la nivelul regiunilor *V* şi *C*, iar lanţul *H* al IgG are patru domenii ($V_H$, $C_H1$, $C_H2$ şi $C_H3$), o moleculă de IgG conţinând în total 12 domenii (fig. 66 A şi 66 B)

*Situsul combinativ (SC)* situat la extremitatea $NH_2$ terminală a fragmentului *Fab*, respectiv a moleculei de Ig, este locul prin care molecula recunoaşte şi leagă specific antigenul sau, altfel spus, este raţiunea funcţională a ei. Este alcătuit din ariile variabile şi hipervariabile de pe $V_H$ şi $V_L$, fiind diferit ca formă, mărime etc.

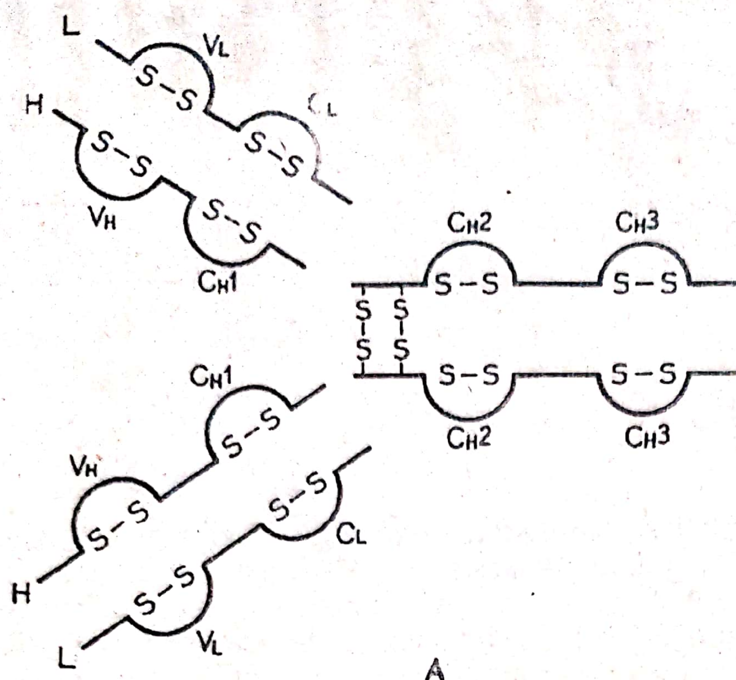



Fig.66A. Domeniile moleculei de imunoglobulină rezultate din stabilirea legăturilor -S-S- "intra lanţ". Lanţul L are 2 domenii iar lanţul H are 4 sau 5 domenii.

O moleculă monomer de IgG are două *SC*, fiecare având o suprafaţă de cca. 1000 $Å^2$, faţă de cca. 70 000 $Å^2$ cât are întreaga moleculă (deci cca. 1/70-1/100 din întreaga ei suprafaţă). Secvenţa aminoacidă a celor trei DR (regiuni de determinare a complementarităţii) de pe $V_L$ uman sunt inserate între 4 segmente *Fr* (cadru) păstrate de-a lungul evoluţiei filogenetice. În "zonele cadru *Fr*" este prezent glicocolul, care pare să contribuie la asigurarea invariabilităţii lor. Prin "cudarea" lanţurilor *H* şi *L*, zonele hipervariabile de pe *H* se apropie de cele de pe *L*, astfel încât formează o unitate funcţională, respectiv "situsul combinativ"(fig. 67 şi 68). Poziţiile corespunzând CDR pot fi ocupate de fiecare din cei 20 de aminoacizi, numărul specificităţilor rezultate fiind destul de larg pentru a corespunde tuturor epitopilor existenţi în natură. Dacă se iau în considerare şi posibilităţile de diversificare date de zonele *Fr,* atunci se realizează la adevărata sa valoare uriaşul potenţial de variabilitate a situsului combinativ. Un *SC* poate astfel lega mai mulţi epitopi înrudiţi structural, legare care se realizează prin interacţiuni necovalente, un rol important revenind Lys şi Tyr. În unele cazuri, se pot forma legături la nivelul unor locuri distincte între antigen şi *SC,* fără asemănări structurale. Acest proces de "legare multispecifică" a diverse antigene total neînrudite sporeşte gradul de diversificare funcţională a potenţialului de recunoaştere a moleculelor de anticorpi.

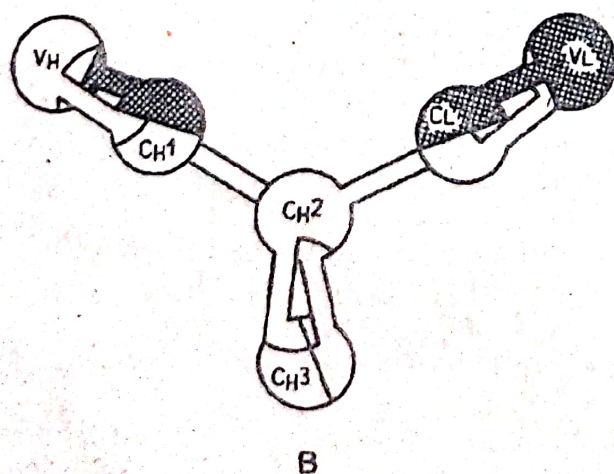



Fig.66B. Reprezentarea "stilizată" a domeniilor moleculei de IgG.

Detectarea aminoacizilor care alcătuiesc *SC* se realizează prin metode de afinitate, care constau din marcarea radioactivă cu $^{14}C$ sau cu $^{3}H$ a unei grupări reactive dintr-o haptenă. Situsul combinativ fixează haptena, gruparea reactivă marcată se leagă la

unul sau mai mulţi aminoacizi, după care fracţiunea peptidică din *SC* care a legat gruparea este izolată prin hidroliză chimică (tratare cu bromcianură-BrCN) şi analizată. Aşa s-a putut stabili că aminoacizii care fixează haptenele sunt în regiunea hipervariabilă a lanţurilor *H* şi *L* şi nu în regiunea *C* (fig. 69).

Regiunea "balama", alcătuită din 15 aminoacizi, este secvenţa care uneşte fragmentele de lanţ *Fd* cu *Fc*, respectiv $C_H1$ cu $C_H2$ a lanţurilor grele. Deci, regiunea balama asigură conexiunea dintre *Fab* şi *Fc*, fiind codificată de un exon separat al ADN. Are o structură primară unică, porţiunea ei centrală constând din două legături disulfidice legate la un helix de prolină, care conferă rigiditate lanţului polipeptidic, restrângându-i rotaţia. De fapt, piesa principală este octopeptidul ciclic, rigid, cu o suprafaţă de cca. 1 000 $Å^2$ şi cu secvenţa:

Fig.67. În vederea realizării "situsului combinativ", lanţurile *L* şi *H* au domeniile variabile de la extremităţile NH2 aranjate în spaţiu într-o manieră care permite zonelor hipervariabile (CDR) să fie situate complementar

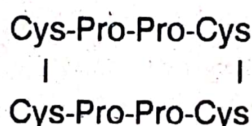






Fig.68. Reprezentarea schematică a "zonelor cadru" (Fr) şi a celor de determinare a complementarităţii (CDR) de la nivelul extremităţilor NH2-terminale ale lanţurilor *H* şi *L*, care formează partea "hipervariabilă" a situsului combinativ.

Punctul rigid acţionează – ca un pivot al părţii flexibile a regiunii balama – tripsina şi papaina, clivând molecula de Ig înaintea pivotului. De altfel, susceptibilitatea la acţiunea enzimei proteolitice a balamalei este evidentă în cazul unor clase de molecule de Ig (IgG), dar nu şi în cazul altor clase (IgA). De exemplu, o moleculă IgG în prezenţa tripsinei, la +60° C, cliveaza în *Fab* şi *Fc*, pe când una

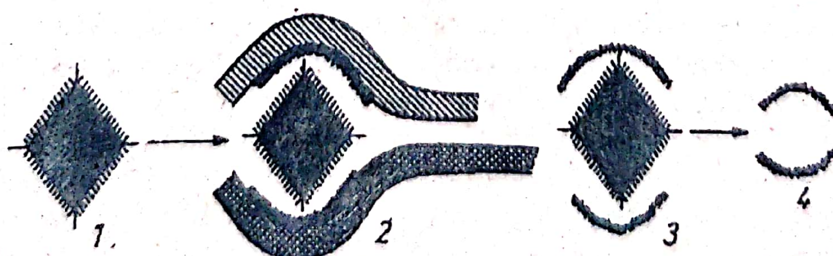



Fig.69. Modalitatea practică de identificare a reziduurilor de aminoacizi de la nivelul domeniilor $V_L$ şi $V_H$. Haptena marcată radioactiv (1) este recunoscută şi fixată la situsul combinativ al moleculei (2), după care se izolează (3) şi se identifică aminoacizii legaţi (4).

de IgA supusă aceluiaşi tratament nu clivează, probabil datorită marelui conţinut de hidraţi de carbon din interiorul şi din apropierea acestei regiuni.

Regiunea balama joacă un rol important în funcţionalitatea moleculei, ei revenindu-i o serie de atribute funcţionale cum ar fi: a) la acest nivel se află legăturile disulfidice dintre lanţurile *H*; b) permite fragmentelor *Fab* să se orienteze în spaţiu în diferite poziţii; c) asigură unirea fragmentelor *Fab* şi *Fc* cu funcţii diferite, într-un complex molecular unic; d) pe la acest nivel se transmit de la *SC* al *Fab* la domeniile constante ale *Fc* efectele complexării moleculei cu antigenul.

Absenţa regiunii balama generează o asociere între *Fab* şi $C_H2$, rezultând o moleculă rigidă, în formă de "T", cu funcţii alterate. Această moleculă este incapabilă să mai lege *C*1q, să interacţioneze cu receptorul pentru *Fc* de pe membrana limfocitelor *B* sau PMN, are o slabă activitate pentru receptorul *Fc* de pe macrofage, o redusă capacitate de a se lega la sinciţiotrofoblastele placentare, dar îşi păstrează nealterată capacitatea de legare a proteinei A a stafilococului (Spa).

Toate acestea demonstrează că regiunea balama are un rol important în conservarea funcţiilor moleculei, permiţând atât flexibilitatea ei, cât şi transmiterea semnalelor de la *SC* la *Fc*.

## FRAGMENTUL *Fab*

Fragmentul *Fab* situat spre extremitatea $NH_2$ terminală, deci la nivelul *Fv*, este alcătuit din regiunile $V_H+V_L$ şi din domeniile $C_H1+C_L$. La nivelul regiunii *V*, aminoacizii sunt înşiruiţi în secvenţe cu diferite grade de variabilitate, dintre care unele sunt mai puţin variabile, iar altele sunt hipervariabile. Primele sunt denumite "regiuni cadru" sau *Fr* ( de la "frame work"= cadru) şi au rol în menţinerea stabilităţii lanţului, iar celelalte, "regiuni de determinare a complementarităţii" sau CDR. O analiză a structurii tridimensionale indică existenţa unor constrângeri geometrice în multe regiuni ale moleculei, care restrâng posibilitatea variaţiei lor în secvenţa aminoacizilor. O asociere constantă a secvenţei aminoacizilor în regiunile *V* ale lanţurilor este conferită de restul Gly care are un rol important în definirea şi stabilizarea structurii. Aceasta, deoarece numai combinaţiile specifice ale aminoacizilor sunt compatibile cu structuri ceva mai constant tridimensionale ale subunităţilor omoloage. De exemplu, secvenţa Phe-Gly-Gly-Gly din poziţia 99-103 de pe $V\lambda$ are echivalent secvenţa Trp-Gly-Gly-Gly din poziţiile 106-110 de pe $V\gamma1$. Secvenţa lanţurilor *H* şi *L* a arătat că regiunile hipervariabile a doua şi a treia sunt mai lungi în $V_H$ decât în $V_L$, în special la nivelul regiunii a treia, hipervariabilă care constă dintr-un număr variabil de aminoacizi (între 13 şi 20 de reziduuri), pe când la $V\lambda$ şi $V\kappa$-sunt doar 11-13 resturi de aminoacizi. Variaţia numărului de aminoacizi în cea dea a treia regiune hipervariabilă a diferitelor lanţuri *H* alterează lungimea buclei hipervariabile, schimbare care are un efect profund asupra lărgimii şi adâncimii situsului combinativ şi, de aici, asupra afinităţii şi specificităţii moleculei de anticorp. Un rol similar modulator este dat de către variaţia în numărul de aminoacizi a primei regiuni hipervariabile *L*, precizată prin studii de cristalografie, difracţii cu raze X, prin complexarea *Fab'* cu o haptenă etc.

Este alcătuit – la clasele IgG, IgA şi IgD – din domeniile constante $C_H2$ şi $C_H3$ unite prin legături disulfidice, iar la clasele IgM şi IgE - din domeniile $C_H2$ - $C_H4$. Prin digestie tripsică, respectiv prin expunerea moleculei de IgG la *p*H 2,5 regiunea dintre domeniile $C_H2$ şi $C_H3$ devine tranzitoriu susceptibilă la clivajul cu plasmină sau tripsină, pentru ca la *p*H neutru să redevină rezistentă la aceste enzime. Prin alchilare şi gel-filtrare se pot obţine domeniile $C_H2$ monomer, iar digestia cu pepsină sau papaină permite obţinerea de *pFc*, respectiv *Fc'*. Aşa s-a demonstrat că domeniul $C_H2$ şi nu domeniul $C_H3$ leagă complementul, că *Fc* este responsabil de rata catabolismului molecular etc. Se poate afirma că fragmentele *Fab* şi *Fc* sunt sediul unei remarcabile dualităţi funcţionale a moleculei de Ig, în sensul că *Fab* leagă specific antigenul, iar *Fc* conferă moleculei posibilitatea de a prezenta antigenul astfel fixat sistemelor celulare de neutralizare a lui (tabelul 38).

*Tabelul 38*

**Unele funcţii ale fragmentelor sau ale unor domenii ale moleculei de imunoglobulină (IgG)**

| Fragmentul sau domeniul | Funcţia |
| --- | --- |
| *Fv* ($V_H$+$V_L$) | Leagă antigenul (formează situsul combinativ) |
| $C_H1$ + $C_L$ | Legături disulfidice care unesc lanţurile *H* şi *L*<br>Legături necovalente intercatenare<br>Asigură legăturile dintre situsul combinativ şi *Fc*<br>Leagă fragmentul $C_4b$ al complementului |
| Balama | La acest nivel sunt legături disulfidice inter-lanţuri *H*<br>Uneşte fragmentul *Fab* cu fragmentul *Fc*<br>Permite poziţionarea în spaţiu a *Fab*<br>Transmite modificările la *Fc* după legarea antigenului de *Fab* |
| $C_H2$ | Leagă fragmentul C1q al complementului<br>Controlează rata de catabolizare a moleculei |
| $C_H3$ | Asigură legături necovalente între lanţuri<br>Leagă molecula la receptorul pentru *Fc* de pe monocite şi macrofage |
| $C_H2$ + $C_H3$ | Leagă proteina A stafilococică<br>Leagă molecula de Ig la receptorul pentru *Fc* de pe celule *K*, neutrofile, celulele sinciţiotrofoblastice<br>Realizează transferul transplacentar |

Principalele proprietăţi funcţionale ale moleculei de Ig mediate de către fragmentul *Fc* sunt următoarele:

– Interacţionează cu proteinele complementului, situsul de legare a componentei *C*1q fiind la nivelul domeniului $C_H2$ al moleculei de IgG. De altfel, sunt două situsuri distincte de legare a *C*1q, câte unul pentru fiecare monomer şi care

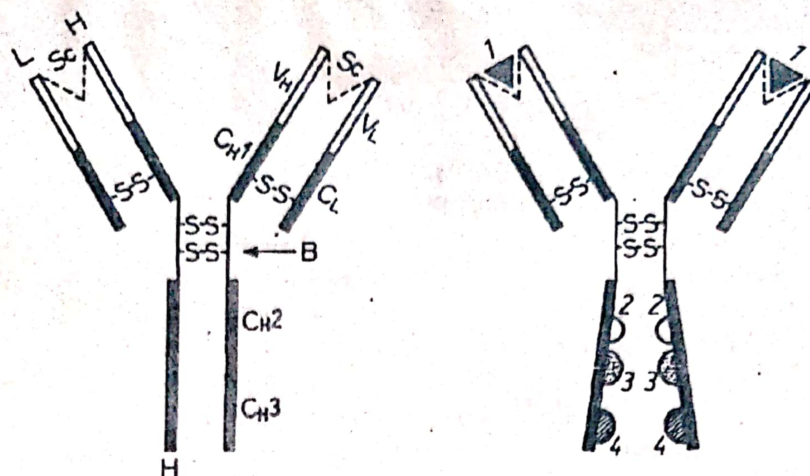



Fig.70. Locuri de legare sau de activare de la nivelul moleculei de imunoglobulină.
1 = situsul combinativ (de legare a antigenului); 2 = situsul de legare a complementului (*C*1q); 3 = situsul de legare a proteinei A stafilococice (SpA); 4 = situsul de legare la receptorii pentru fragmentul *Fc* (*FcR*); B = regiunea "balama"; SC = situs combinativ (1).

funcţionează independent (fig. 70). Se pare că din punct de vedere funcţional acest situs este mai dependent de conformaţia moleculei decât de structura ei. Interacţiunea cu factorii reumatoizi se realizează la nivelul domeniului $C_H2$, molecula de IgG de la reumatici diferind conformaţional de cea a indivizilor sănătoşi .

– Interacţionează cu proteina A stafilococică (SpA), o moleculă alfahelicoidală cu greutatea moleculară de cca. 43 kD, lipsită de Cys şi alcătuită din cinci regiuni (ABCDX) a câte 60 de reziduuri de aminoacizi, fiecare cu greutatea moleculară de cca. 7 kD. Regiunile au câte un situs activ care reacţionează cu *Fc* al moleculei de IgG la mamifere, dar nu şi de pasăre, situsul de legare interesând două segmente din domeniul $C_H2$ şi unul din $C_H3$. Mai au un situs adiţional şi pentru *Fab,* situat pe $C_H1$, care ar facilita legarea SpA la alte clase de Ig (IgA, IgE, IgM) în afară de clasa IgG.

– Interacţiunea SpA cu IgG liber sau sub formă de receptori de membrană şi-a găsit o largă aplicare practică: obţinerea de anticorpi hibrizi legaţi prin SpA, folosirea SpA în plasmafereză ca mijloc de epurare a moleculelor de IgG care au legat antigene tumorale, sau a celulelor cu receptori imunoglobulinici (cromatografie de afinitate cu SpA +Sepharoză), studiul efectelor induse de către antigen asupra moleculei de anticorp etc. De exemplu, după legarea moleculei de antigen la *Fc* al IgG, se instalează o "dezordine" la nivelul domeniului $C_H2$ care-şi modifică componenţa glucidică, molecula de IgG devenind capabilă să lege ConA, pe care în mod obişnuit nu o leagă (această capacitate o are numai molecula de IgM). Anticorpii IgG de pasăre, care în mod normal nu leagă SpA, după ce au fixat antigenul, devin capabili să lege SpA. Molecula de SpA legată la o moleculă de IgG liberă favorizează fixarea *C*1q a complementului, în timp ce legarea SpA la o moleculă de IgG care a fixat antigenul inhibă legarea *C*1q. Fragmentul *Fc* asigură interacţiunea moleculei de Ig cu receptorii pentru *Fc (FcR)* de pe membrana macrofagelor, limfocitelor *B, K, T, NK* etc. Responsabil de această funcţie este domeniul $C_H3$ al *Fc*. De exemplu, inhibiţia rozetelor EA formate de eritrocitele de bovine care au fixat prin *Fab* anticorpii şi celulele care au *FcR* este posibilă numai atunci când celulele cu *FcR* sunt în prealabil incubate cu molecula întreagă de Ig sau cu domeniul $C_H3$, dar nu atunci când sunt incubate cu domeniile *Fab* sau $C_H2$.

– Transportul transplacentar al Ig este posibil datorită legării moleculei prin *Fc* la membrana celulelor placentei, procesul fiind dependent de *p*H.

– Reglarea catabolismului moleculei este condiţionată de prezenţa *Fc*. Moleculele diferitelor clase şi subclase de imunoglobuline au o perioadă de înjumătăţire diferită, locul responsabil pentru controlul metabolismului lor fiind la nivelul domeniului $C_H2$ al *Fc*. Inoculat separat *in vivo*, $C_H2$ are o durată de viaţă similară cu cea a *Fc* sau a moleculei de Ig, pe când $C_H3$ şi *Fab*, sunt distruse într-un timp mult mai scurt. Deci, situsul de reglare a catabolismului molecular de Ig este la nivelul domeniului $C_H2$ al *Fc* (tabelul 39).

*Tabelul 39*

**Perioade de înjumătăţire a moleculei IgG murine şi a diferitelor fragmente ale ei (valori medii + deviaţia standard a mediei)**

| Proteina | Timp de înjumătăţire (T1/2) |
|---|---|
| IgG | 74,0 ± 6,9 |
| *Fc* | 70,0 ± 7,7 |
| $C_H2$ | 61,5 ± 7,8 |
| $C_H3$ | 15,6 ± 0,9 |
| *Fab* | 17,1 ± 1,0 |

ETEROGENITATEA IMUNOGLOBULINELOR

Imunoglobulinele sunt eterogene din punct de vedere al încărcăturii electrice (migrează între zonele *alfa* şi *gamma*), al specificităţii lor de anticorp, din punct de vedere antigenic etc. Această enormă diversitate a lor este generată de secvenţa aminoacizilor de la nivelul diferitelor fragmente, şi anume: la nivelul *Fc* sunt generate diferenţe antigenice pe baza cărora Ig se împart în diferite clase şi specificităţi, realizându-se aşa-zisele "specificităţi izotipice"; la nivelul *Fab*, care este sediul unde se leagă antigenele şi unde se formează specificităţi idiotipice, iar la nivelul modulului $C_H1+C_L$ şi al domeniului $C_H2$ se pot realiza specificităţi antigenice proprii numai unor grupe de indivizi din cadrul aceleiaşi specii, respectiv "specificităţile alotipice". Prin "specificitate izotipică" se înţelege caracterul antigenic al moleculelor de imunoglobulină caracteristic tuturor indivizilor unei specii, ale căror forme polimorfe nu sunt controlate de legi mendeleene. Pe baza acestei specificităţi, în cadrul aceleiaşi specii sunt mai multe clase şi subclase de molecule de Ig, care diferă sub raportul proprietăţii lor antigenice şi funcţionale. La mamifere se cunosc 5 clase de imunoglobuline, în cadrul cărora pot exista mai multe subclase. Astfel, IgG are 4 subclase care se deosebesc prin secvenţa aminoacizilor la nivelul lanţurilor *H* şi prin numărul legăturilor disulfidice: subclasele IgG1 şi IgG4 au câte 4 legături (punţi) între lanţuri. Subclasa IgG2 are şase punţi disulfidice intercatenare. Lanţurile *H* ale subclaselor IgG1 şi IgG2, IgG3 şi IgG4 sunt notate $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ şi $\gamma 4$. Cele două subclase IgA se deosebesc între ele prin modul de legare a lanţurilor *L* şi *H*. La variantele izotipice contribuie şi frecvenţa răspândirii lanţurilor uşoare k şi $\lambda$ la oameni. Majoritatea lanţurilor $\lambda$ încep

la extremitatea N-terminală cu o grupare aminică blocată (acidul pirolidon-carbonic), în timp ce lanţurile k au la extremitatea $NH_2$ terminală, acidul glutamic sau asparagina. Pentru lanţurile *lambda* sunt de asemenea cunoscute trei subtipuri. Astfel, diferenţele izotipice sunt determinate de către secvenţa aminoacizilor în regiunea constantă a lanţurilor *H*, de numărul şi poziţia punţilor disulfidice etc.

Deci, **specificităţile izotipice** definesc caracterele antigenice ale moleculelor de imunoglobuline specifice indivizilor aparţinând unei specii, cele alotipice – caracterele antigenice specifice unor grupuri de indivizi din cadrul unei specii, iar cele idiotipice – caracterele antigenice ale moleculelor de imunoglobuline care recunosc un anumit determinant antigenic din cadrul populaţiei de molecule de imunoglobuline aparţinând aceluiaşi individ (tabelul 40).

*Tabelul 40*

**Principalele caracteristici ale specificităţilor izotipice, alotipice şi idiotipice**

| Specificitatea | Modul de exprimare | Specificitatea antigenică situată pe | Implicarea legilor lui Mendel în transmitere | Specificitatea este recunoscută ca non proprie de către |
|---|---|---|---|---|
| Izotipică | Clase şi subclase de Ig (IgG, IgA etc.) | Toată lungimea regiunilor $C_H$ şi $C_L$ | Nu | Toţi indivizii unei alte specii, dar nu şi de către cei ai speciei de la care provin moleculele |
| Alotipică | Sisteme alotipice (Gm, InV, Am, IsF etc.) | În anumite poziţii din regiunile $C_H$ şi $C_L$ | Da | Numai unii indivizi aparţinând aceleiaşi specii cu cei de la care provin moleculele |
| Idiotipică | O enormă varietate de specificităţi idiotipice | Regiunile hipervariabile $V_H$ şi $V_L$ | Nu | Acelaşi individ care a produs anticorpul |

În cadrul specificităţilor izotipice, condiţionat de caracterul antigenic al moleculelor de imunoglobuline, se cunosc clase şi subclase cu proprietăţi funcţionale particulare (tabelul 41).

*Clasa IgG.* Sunt imunoglobulinele cele mai bine cunoscute, care reprezintă cca. 75% din totalul Ig din serul uman normal. Datorită faptului că este uşor de obţinut în stare pură, această clasă a fost cel mai intens studiată atât biochimic cât şi funcţional. Au constanta de sedimentare 7 S şi greutatea moleculară de cca. 150 kD. Moleculele sunt termorezistente, nefiind denaturate în 30 de minute la $+75^{\circ}$ C.

Moleculele IgG apar după stimulul antigenic secundar şi sunt principalii anticorpi cu rol în neutralizarea toxinelor, virusurilor, bacteriilor, în fagocitoza opsonică, citotoxicitatea anticorp-dependentă etc. Aceste molecule activează complementul (cu excepţia subclasei IgG4), se fixează la piele (cu excepţia subclasei IgG2) şi pot traversa placenta.

**Proprietățile biologice şi fizico-chimice ale diferitelor clase de imunoglobuline umane**

| Proprietatea | Clasa de imunoglobuline | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | IgG | IgA | IgM | IgD | IgE |
| Lanţul greu este de tip | $\gamma$ | $\alpha$ | $\mu$ | $\delta$ | $\varepsilon$ |
| Formula moleculară este | $\gamma_2 k_2$ sau $\gamma_2\lambda_2$ | $\alpha_2 k_2$ $\alpha_2\lambda_2$ şi $(\alpha_2 k_2)_2$+J+PS sau $(\alpha_2\lambda_2)_2$+J+PS | $(\mu_2 k_2)_5$+J sau $(\mu_2\lambda_2)_5$+J | $\delta_2 k_2$ sau $\delta_2\lambda_2$ | $\varepsilon_2 k_2$ sau $\varepsilon_2\lambda_2$ |
| Concentraţia în ser (mg/ml) | 8 - 12 | 1,4 - 4,0 | 0,5 - 1,9 | 0,03 - 0,4 | 0,0001 |
| Greutatea moleculară (kD) | 150 - 160 | 170 în ser, 400 în secreţii | 900 | 185 | 190 |
| Concentraţia extravasculară (%) | 60 | 60 | 20 | 25 | 50 |
| Coeficient de sedimentare *S* | 7 | 7; 9; 11 | 19 | 7 | 8 |
| Greutatea lanţului *H* (kD) | 53 | 56 | 65 | 69 | 72 |
| Nr. domeniilor lanţului *H* | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 |
| Hidraţi de carbon (%) | 2 - 5 | 8 - 10 | 10 - 12 | 12 - 15 | 11 - 12 |
| Numărul subclaselor | 4 | 2 | - | - | - |
| Numărul situsurilor combinative | 2 | 2; 4; 6 | 2 sau 10 | 2 | 2 |
| Prezenţa lanţurilor de unire J | - | + | + | - | - |
| Rezistenţa la +56°C | + | + | + | - | - |
| Rezistenţa la 2-mercapto-etanol | ++ | ± | - | ++ | - |
| Determinante izotipice (subclase) | 1; 2; 3; 4 | 1; 2 | – | – | – |
| Determinante alotipice: Gm*(H)* | + | - | - | - | - |
| InV *(L)* | + | + | + | - | - |
| Am | - | + | - | - | - |
| Sinteza (mg/kg/zi) | 30 | 8 - 27 | 6 - 8 | 0,4 | ? |
| Catabolism (%/zi) | 3 | 12 | 14 | ? | 2,5 |
| Perioada de înjumătăţire (zile) | 21 (la $IgG_3$=7) | 7 | 5,1 | 2,8 | 2,3 |
| Capacitatea de fixare a complementului (cale clasică) | + ($IgG_4$ nu) | - * | ++ | - | - |

| Proprietatea | Clasa de imunoglobuline | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | IgG | IgA | IgM | IgD | IgE |
| Pasajul transplacentar | + | - | - | - | - |
| Legarea la receptorul *Fc* de pe: - macrofage | + | - | - | - | - |
| - mastocite | - | - | - | - | + |
| - limfocite | + | + | + | ? | - |
| Legarea SpA (proteinei A) | + | - | - | - | - |

* IgA activează complementul pe cale alternativă

Prin purificarea Ig provenite de la bolnavi cu mielom şi cu ajutorul serurilor imune obţinute faţă de aceste proteine-mielom, s-a constatat în interiorul acestei clase majore IgG existenţa a patru grupe distincte de molecule, care formează patru subclase IgG (tabelul 42) existente la toţi indivizii (deci sunt izotip). Dozarea exactă a concentraţiei lor în ser a putut fi realizată numai după ce s-au pus la punct metodologia de investigare care utiliza anticorpii monoclonali şi tehnicile imuno-enzimatice. Aşa s-a putut preciza că, de multe ori, dozarea cantitativă a IgG totale este irelevantă, deoarece în unele afecţiuni sunt modificări la nivelul IgG2 sau IgG4, cum ar fi de exemplu infecţiile severe ale căilor respiratorii, fără ca valoarea globală a IgG să fie modificată. Subclasele diferă între ele prin numărul legăturilor disulfidice între lanţurile *H*, prin poziţia acestor legături între *H* şi *L*, prin sensibilitatea la proteoliza enzimatică, prin markerii alotipici şi prin proprietăţile lor biologice (fig. 71).

*Tabelul 42*

**Unele caracteristici şi proprietăţi ale subclaselor de IgG**

| Caracterul, proprietatea | Subclase | | | |
|---|---|---|---|---|
| | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 |
| Procent din totalul de molecule IgG | 66 | 23 | 7 | 4 |
| Lanţul greu | $\gamma 1$ | $\gamma 2$ | $\gamma 3$ | $\gamma 4$ |
| Fixarea complementului | + | + | + | - |
| Transfer prin placentă | + | + | + | + |
| Legarea proteinei A | + | + | - | + |
| Sensibilizarea pielii de cobai | + | - | + | + |
| Numărul dublelor legături disulfidice | 2 | 4 | 15 | 2 |
| Timp de înjumătăţire (zile) | 23 | 23 | 8 | 23 |
| Fixarea la receptorii *Fc* de pe: | | | | |
| macrofage | + | - | + | - |
| celule *K* | + | - | + | - |
| granulocite PMN | + | + | + | + |
| sinciţiotrofoblast | + | + | + | + |

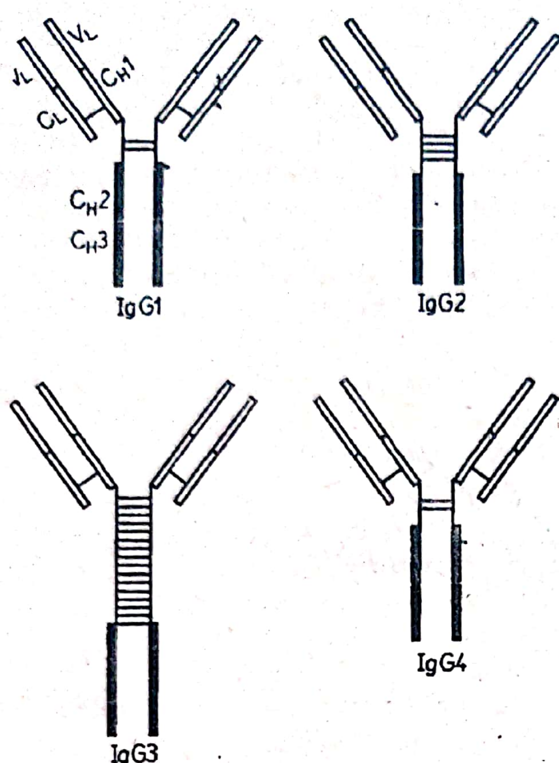



Fig.71. Legăturile disulfidice (-S-S-) la subclasele de IgG. Subclasele IgG1 şi IgG4 au câte două legături -S-S- între lanţurile *H*, subclasa IgG2 are 4 legături, iar lanţurile *H* ale subclasei IgG3 sunt legate prin 15 legături -S-S-.

Moleculele de anticorp din clasa IgG, care apar în cursul stimulului secundar sau prin comutare după stimulul primar, inhibă sinteza anticorpilor din clasa IgM printr-un proces de "reglare inversă" (sau "feedback" în terminologie anglo-saxonă), competiţionând cu antigenele. Sinteza moleculelor de IgG aparţinând diferitelor subclase este condiţionată de natura stimulului antigenic: de exemplu, dextranul stimulează sinteza moleculelor din subclasa IgG2, cofactorul VIII a celor din subclasa IgG4 etc. Polenul activează sinteza anticorpilor IgG4, antigenele D *(Rh)* a celor IgG1 şi IgG3, iar toxinele tetanică şi difterică, a celor IgG1.

*Clasa IgM* . Moleculele IgM au greutatea moleculară cea mai mare (950 - 1000 kD). Reprezintă cca. 5-10% din totalul imunoglobulinelor şi constituie anticorpii de răspuns primar, care apar după primul contact cu antigenul. Ca şi celelalte Ig, se găsesc sub formă de molecule libere în circulaţie, pentamerii $(\mu_2 L_2)_5$ şi sub formă fixă, de receptori pentru antigen pe membrana limfocitelor *B*. Pentamerul este alcătuit din cinci unităţi identice, legate între ele prin legături disulfidice, şi are 10 situsuri identice de combinare cu antigenul dintre care sunt active numai cinci. Formele monomer se găsesc în ser în concentraţii foarte mici, care însă cresc într-o serie de boli cum ar fi lupusul eritematos sistemic, ataxia-telangiectazia, macroglobulinemia Waldenström etc. În afară de lanţurile $\mu$ şi *L*, molecula IgM are un al treilea lanţ, care uneşte "mănunchiul" de monomeri, din care cauză a fost denumit lanţ *J*, sau "lanţ de unire" (de la "joining chain"). Lanţul *J* lipseşte la formele monomer fiind prezent numai la pentamer (fig. 72).

Lanţul greu al acestei molecule are cinci domenii, unul variabil *(V)* şi patru constante *(C)*. Molecula pentamer are formă de "stea", care se modifică în funcţie de relaţia ei cu antigenul, putând lua formă de "masă rotundă" atunci când reacţionează cu un număr mic de molecule de antigen, sau de "păianjen" atunci când reacţionează cu numeroase molecule de antigen.

Moleculele IgM au o mare capacitate de aglutinare, precipitare sau de liză şi, în special, au o mare capacitate de activare a complementului, capacitate care depăşeşte de cca. 100 de ori pe cea a moleculelor IgG. Activarea complementului de către IgG se poate realiza numai în condiţia existenţei a două molecule foarte apropiate care să lege prin fragmentele lor *Fc* componenta *C*1q, condiţie obligatorie pentru declanşarea cascadei activatoare. În cazul IgM, dat fiind că molecula este pentamer şi are cinci fragmente *Fc* legate împreună prin lanţul *J*, este suficientă o singură moleculă pentru activare, deoarece se realizează condiţia obligatorie, şi anume legarea *C*1q la două fragmente *Fc*. Situsul de activare a complementului este situat la nivelul domeniilor $C\mu3$ - $C\mu4$ şi devine accesibil în urma schimbărilor de conformaţie a moleculei după ce aceasta a fixat antigenul. Se pare că lanţul *J* nu are nici un rol în fixarea complementului, deoarece

monomerii desprinşi din pentameri pot lega şi activa complementul la aceeaşi intensitate, dacă se respectă deziderатul major, adică existenţa a două fragmente *Fc* apropiate. În dezvoltarea ontogenică apare pentru prima dată clasa de imunoglobuline IgM. De aceea, în serul nou-născutului imunoglobulina dominantă aparţine acestei clase. Dar, chiar şi la această vârstă fragedă,un nivel prea mare de anticorpi IgM sugerează existenţa unor infecţii care de regulă recunosc ca agenţi etiologici virusul rujeolos, virusul citomegalic, toxoplasma, *Spirocheta pallidum* etc. Această clasă de molecule este responsabilă de activitatea bactericidă a serului, cu referire specială la apărarea imună mediată celular faţă de salmonele, la răspunsul imun faţă de fragmentul *Fc* al IgG în boala reumatismală (factorul reumatoid) etc.

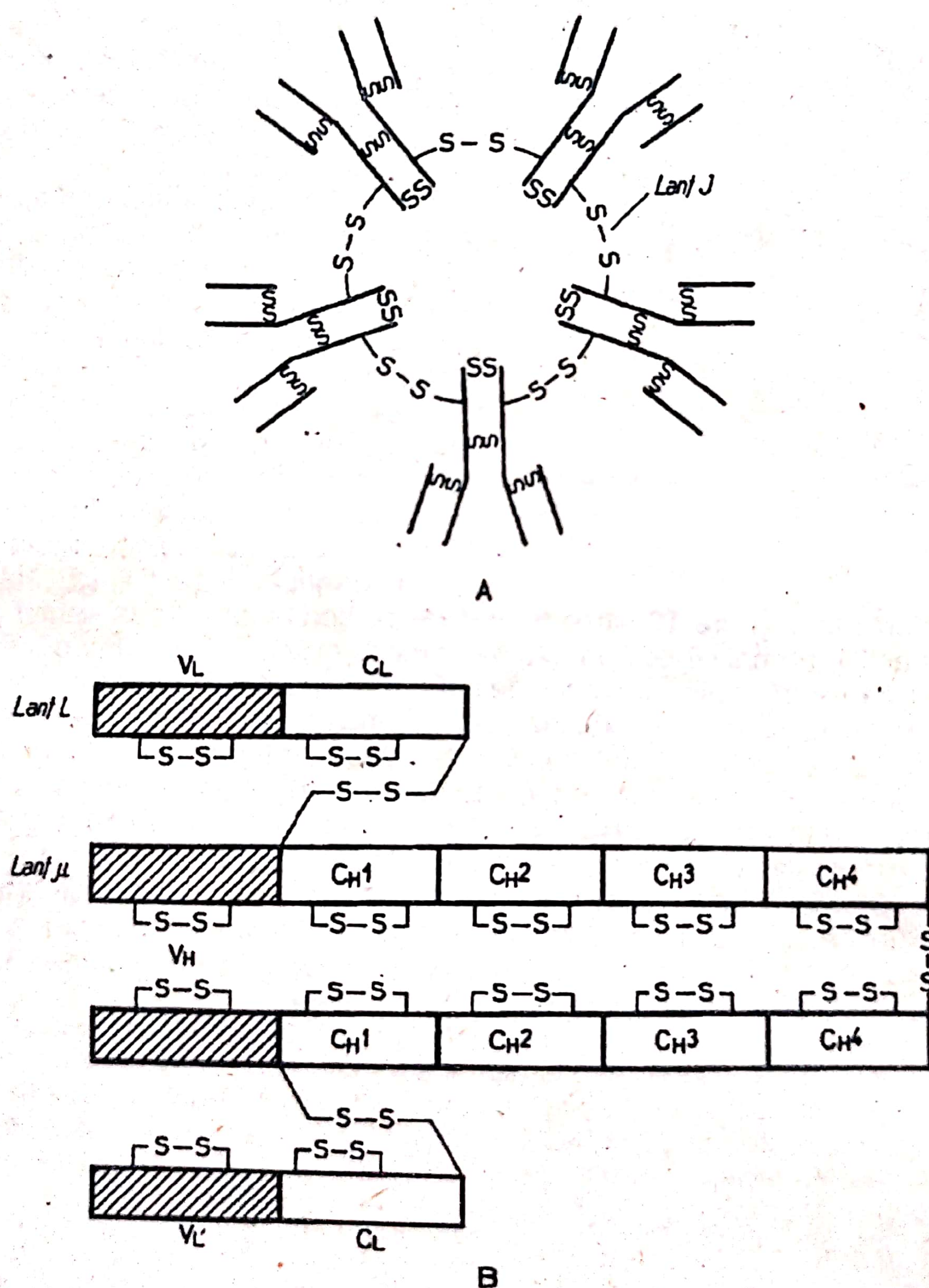



**Fig.72. Molecula de IgM pentamer (A) şi monomer (B). Molecula pentamer este alcătuită din 5 monomeri, legaţi între ei printr-un "lanţ de legare" sau J. Fiecare monomer are câte 4 domenii constante ($C_H$) cu legături -S-S- între lanţurile grele.**

Spre deosebire de alte clase de imunoglobuline, sinteza ei este mai puţin influenţată de acţiunea unor factori imunodepresori, deşi în sindroame de malabsorbţie şi în infecţii cronice se înregistrează o scădere a concentraţiei IgM seric. Creşte concentraţia în artrite reumatoide şi în hepatite. În cursul macroglobulinemiei Waldenström, creşterea considerabilă a IgM monoclonal în ser şi tendinţa de a forma polimeri duc la instalarea unui "sindrom de hiperviscozitate" care de multe ori poate fi fatal pentru pacient, din care cauză se impun adesea intervenţii rapide prin plasmafereze abundente.

Datorită volumului mare al acestei molecule, denumirea iniţială a IgM pentamer a fost de beta2-macroglobulină.

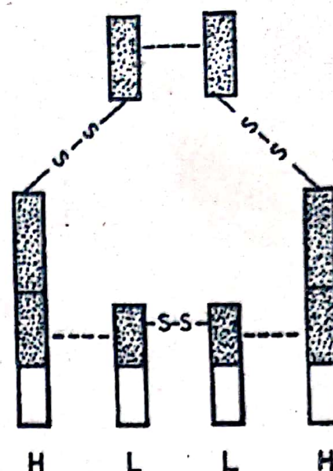



Fig.73. Subclasa IgA2. Este singura moleculă de imunoglobulină la care lanţurile L sunt situate în interior, fiind legate între ele prin legături -S-S-. De lanţurile H, lanţurile uşoare sunt legate prin legături necovalente (----).

*Clasa IgA* este alcătuită din două sisteme de imunoglobulină, şi anume din IgA seric şi IgA secretoriu, cu alcătuiri moleculare distincte.

IgA serică este prezentă în concentraţie relativ mare, de cca. 2 g /l reprezentând cca. 15-20% din totalul imunoglobulinelor aflate în circulaţie. Deşi se găseşte din abundenţă în ser, totuşi încă nu se cunosc anticorpii care să recunoască specific unii determinanţi antigenici şi care să aparţină acestei clase de imunoglobuline. Molecula, de regulă, este sub formă de monomer cu un coeficient de sedimentare 7 S şi greutatea moleculară de 160 kD, alcătuită după acelaşi model ca şi dimerul "clasic" IgG cu două lanţuri $\alpha$ şi două lanţuri *L* de tip k sau $\lambda$,cu dominaţia celor k. Se găsesc, mai ales în cazuri de mielom, dimeri sau chiar polimeri IgA care, pe lângă cele două lanţuri, mai au al treilea lanţ, lanţul de unire *J*.

Se cunosc două subclase de IgA, şi anume IgA1 care se găseşte în proporţie de 80% în ser şi care are lanţul $\alpha$ mai scurt cu cca. 40 reziduuri de aminoacizi şi IgA2 cu o structură originală, în sensul că lanţurile *L* nu sunt unite la cele $\alpha$ prin legături disulfidice, ci prin forţe covalente (fig. 73). Din această cauză, lanţurile $\alpha$2 se pot disocia de lanţurile *L* numai în prezenţa ureei sau guanidinei, fără a mai fi necesară prezenţa reductorilor. Clasa IgA este mai bogată în hidraţi de carbon decât clasa IgG, aceştia legându-se în special la regiunea balamalei.

IgA secretorie este principala imunoglobulină existentă în secreţiile salivare, nazale, bronşice, gastrointestinale şi mamare, fiind secretată de către plasmocitele prezente în "lamina propria". Structura sa diferă de structura IgA seric, fiind un dimer cu constanta de sedimentare 11S şi greutatea moleculară 400 kD, format din doi monomeri 7 S legaţi prin lanţul *J*. Dimerul mai conţine o proteină suplimentară denumită "piesa secretorie" sau "piesa S" care nu are nici o relaţie structurală sau genetică cu molecula IgA, fiind sintetizată de către celulele epiteliale şi nu de către plasmocite (fig. 74). Piesa S serveşte ca ligand al dimerilor IgA pentru suprafaţa celulelor epiteliale, ajutând la traversarea acestora de către dimer şi la conferirea unei rezistenţe particulare faţă de acţiunea enzimatică, activată la aceste nivele. Aproximativ 60% din moleculele IgA din secreţiile externe sunt dimeri, cca. 40% sunt polimeri şi un număr extrem de mic există sub formă de monomeri.

Pentru ca aceste molecule să ajungă în secreţiile de pe suprafaţa mucoaselor, ele nu trec printre celulele epiteliului ci prin citoplasma acestora. Această "trans-

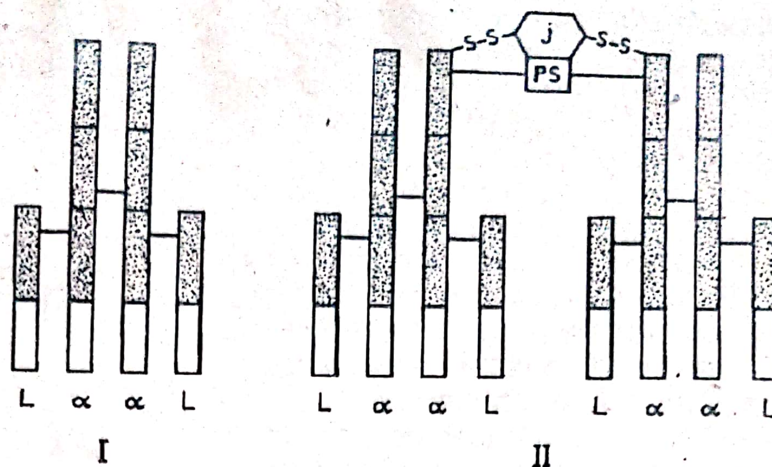



Fig.74. Moleculele de IgA monomer (I) şi dimer (II).
PS = piesa secretorie; J = lanţul de unire care leagă lanţurile $\alpha$ prin legături -S-S-.

citoză epitelială" este mediată de către un receptor imunoglobulinic polimeric care are în componenţa sa şi piesa secretorie (fig. 75). Molecula IgA se leagă la receptorul polimeric, după care este endocitată şi transportată împreună cu acesta spre cealaltă extremitate a celulei. Aici are loc clivajul proteolitic, urmat de eliberarea IgA la care rămâne ataşată acea parte a receptorului polimeric care este "componenta secretorie".

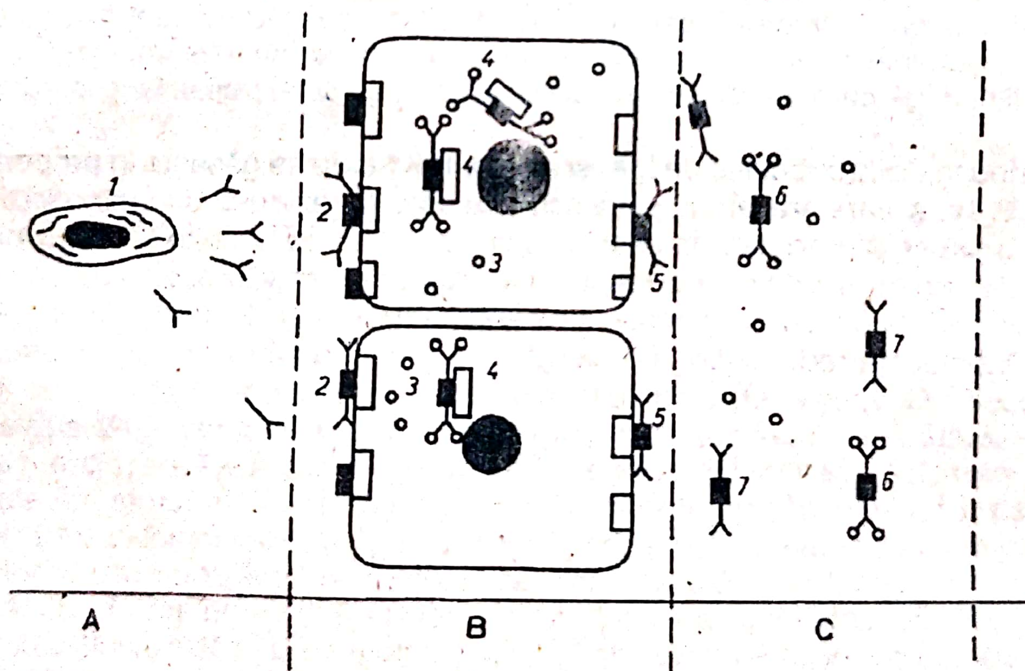



Fig.75. Traversarea epiteliului intestinal de către moleculele de IgA secretorii. Sintetizate de către plasmocitele aflate în "lamina propria" (1), moleculele se fixează la "receptorul polimeric" de la nivelul peretelui celular (2). Împreună cu acesta, pătrund în citoplasmă unde neutralizează eventualele microorganisme ajunse aici (3,4). Traversează celulele părăsindu-le pe la polul opus (4), ajungând pe suprafaţa epiteliului intestinal, având o parte din "receptorul polimeric" care este de fapt "piesa secretorie" (5). În lumenul intestinului, IgA neutralizează bacteriile blocându-le posibilitatea de aderenţă la celule (6). În acest mod, moleculele de IgA (7) protejează organismul de agresiunea microorganismelor aflate atât intracelular cât şi extracelular (adaptare după M.B. Mazanec şi col.).

În diferite secreţii ale organismului uman, IgA se găseşte în concentraţii diferite. Astfel, în salivă sunt 28 mg%, în colostru 151 mg%, în secreţiile oculare 7 mg%. în cele bronşice 10-70 mg%, în intestinul subţire 75 mg%, în vezica biliară 50 mg%, în prostată 25%. Concentraţia cea mai redusă este în secreţiile vaginale (6 mg%). Spre deosebire de aceste secreţii unde predomină IgA, în altele, ca de pildă lichidul sinovial, lichidul amniotic, pleural, cefalorahidian etc., predomină moleculele de IgG, raportul IgG/IgA fiind în jurul valorii de 5/1. Anticorpii din clasa IgA nu pot aglutina, precipita sau liza antigenele corpusculare, dar pot activa complementul pe cale alternativă (nu clasică). Cu toate acestea, IgA secretor are o capacitate bactericidă mare, fiind de opt ori mai activă faţă de *E. coli* decât moleculele IgM şi de 25 de ori decât cele IgG. De asemenea, joacă un mare rol în apărarea locală antivirală. Mecanismul de acţiune al acestei clase de Ig nu este încă suficient cunoscut. Se presupune că aceste imunoglobuline ar împiedica penetrarea bacteriilor în celulele epiteliale ale mucoaselor inhibând fixarea microbilor pe suprafaţa acestora.

Se pare că IgA ar acţiona la trei niveluri, şi anume: a) la nivel extern, pe suprafaţa mucoaselor lumenului intestinal unde-şi exercită efectul lor bactericid; b) intracelular, adică intracitoplasmatic, unde în cursul transcitozei neutralizează germenii cantonaţi aici datorită parazitismului lor intracelular obligatoriu şi c) în "lamina propria", adică sub membrana epitelială bazală, unde se găsesc plasmocitele secretoare de IgA.

Copiii se nasc fără IgA serică, pe care o primesc prin laptele matern unde se găseşte în concentraţii ridicate. Sinteza proprie începe cam la 30 de zile de la naştere. De aceea, copiii sugari care se alimentează natural (cu lapte matern) sunt mai puţin expuşi la infecţii intestinale şi respiratorii, în comparaţie cu cei ce se alimentează artificial sau mixt. Indivizii care au un nivel scăzut de IgA suferă de infecţii ale căilor respiratorii, datele dovedind încă o dată rolul acestei clase de imunoglobuline în protecţia intestinală şi respiratorie. Probabil că ea reglează numărul germenilor şi mai ales componenţa florei bacteriene de la nivelul mucoaselor. Indivizii cu deficit IgA (sunt cam 1 la 700 de subiecţi) sunt susceptibili la boli autoimune, la infecţii ale căilor respiratorii etc. În serul acestora, nivelul IgG şi IgM se menţine în limite normale şi, uneori, pot fi puşi în evidenţă anticorpi anticolagen.

*Clasa IgD* a fost descoperită în anul 1965 de către D.S.ROWE şi F.L.FAHEY în serul unui bolnav cu mielom. Nivelul său fiziologic în ser este foarte redus, fiind de cca. 300 de ori mai mic decât cel al anticorpilor din clasa IgG (cca. 40 mg/l) concentraţia nedepăşind 1% din totalul imunoglobulinelor. Molecula, cu greutatea moleculară de cca. 180 kD şi constanta de sedimentare 7 S este alcătuită din două lanţuri $\delta$ şi două lanţuri *L* de tip k sau $\lambda$. Lanţul $\delta$ are trei domenii constante şi o regiune balama foarte lungă (65 reziduuri de aminoacizi) responsabilă de marea susceptibilitate a acestei clase la proteoliza enzimatică. Lanţurile $\delta$ sunt puternic glicozilate (12%). Catabolismul acestei molecule este extrem de rapid, perioada sa de înjumătăţire fiind de cca. trei zile. Există în organism sub formă de molecule solubile, care circulă în plasma sangvină (0,03-00,4 g/l) şi sub formă de receptor pentru antigen pe membrana limfocitelor *B* care are un segment hidrofob la extremitatea COOH terminală prin care molecula se fixează la membrana celulară. Datorită existenţei acestui segment, masa moleculară a receptorului IgD este mai mare decât cea a moleculei libere. Celelalte proprietăţi ale IgD seric şi membranar

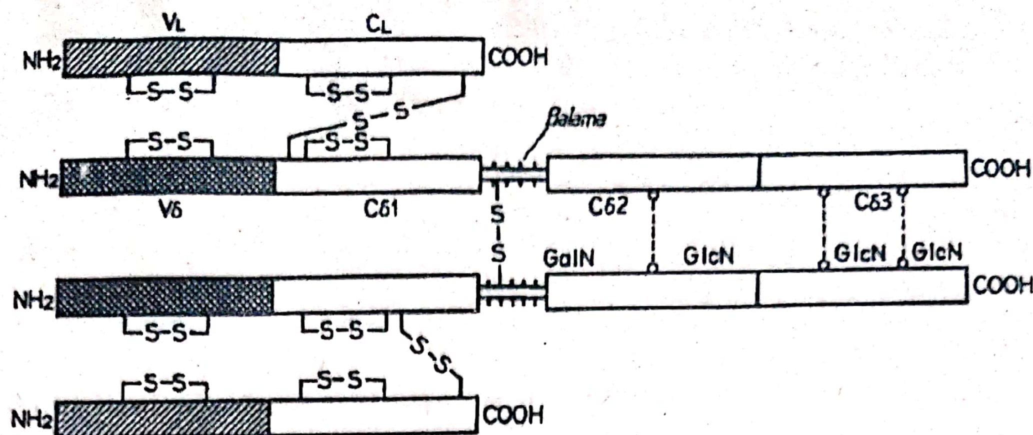



Fig.76. Molecula IgD. Poziţia hidraţilor de carbon este marcată prin cercurile albe, unite între ele prin linii întrerupte. Regiunea "balama" este foarte lungă.

sunt identice, neexistând diferenţe de antigenicitate de structură sterică sau de alt gen de caractere (fig. 76).

Se pare că activitatea biologică, în special a moleculelor serice, este de importanţă minoră. IgD nu fixează şi nu activează complementul, nu traversează placenta, nu sensibilizează pielea cobaiului, nu provoacă degranularea mastocitelor, nu se fixează citofil pe monocite sau limfocite. Ar juca un rol important numai la nivel celular, ca receptori pentru antigen pe limfocitele *B*, asociaţi cu receptorii IgM monomeri. S-ar putea să joace un rol de receptor activ în diferenţierea celulară şi în instalarea memoriei celulare.

Concentraţia în ser creşte de la naştere până la vârsta de 15 ani, după care rămâne la un nivel constant toată viaţa individului, cu excepţia unor stări patologice ca astmul bronşic, boala reumatoidă, boala Hodgkin, leucemia limfatică cronică, lupusul eritematos şi, bineînţeles, mielomul IgD unde se înregistrează valori mai mari decât cele obişnuite. De asemenea, pragul IgD seric creşte în serul femeilor gravide, creştere care este mai accentuată în momentul expulziei fetusului, precum şi în unele infecţii cronice la copii.

Au fost evidenţiaţi anticorpi aparţinând acestei clase faţă de penicilină, insulină, toxină difterică, lactoproteine etc.

*Clasa IgE* a fost descoperită de către K. ISHIZAKA în anul 1966, constituind aşa-numitele molecule de "anticorpi reaginici", sau "anticorpi sensibilizanţi ai pielii" sau "hemocitotropi". Ca şi celelalte Ig, molecula IgE este alcătuită din două lanţuri grele ($\varepsilon$) şi două uşoare *(L)* de tip k sau $\lambda$ (fig. 77) cu greutatea moleculară de 180 kD şi constanta de sedimentare de cca. 8 S. Lanţurile $\varepsilon$ au 5 domenii şi conţin un procent mare de hidraţi de carbon (cca. 11%). Greutatea moleculară a lanţurilor grele ale acestei molecule este foarte mare (cca. 75kD). În colostru, concentraţia este crescută, de ordinul sutelor de nanograme, dar ulterior în laptele matern scade, rămânând la valori crescute numai la mamele cu alergoze. Nu se transmite transplacentar, fetusul primind-o prin colostru şi începând s-o sintetizeze încă din viaţa embrionară.

Atât moleculele de IgD cât şi cele de IgE sunt foarte sensibile la acţiunea temperaturilor ridicate, denaturându-se practic total după încălzirea serului la +56°C timp de 30 de minute, fapt neînregistrat la celelalte clase de Ig. Încălzirea IgE duce la pierderea capacităţii sale reaginice, de stimulare a degranulării bazofilelor şi mastocitelor, dar nu şi la modificarea capacităţii sale de recunoaştere specifică a antigenului, adică la alterarea funcţiei de anticorp. Anticorpii din clasa IgE nu activează complementul, se leagă citofil la receptorii *Fcε* de pe

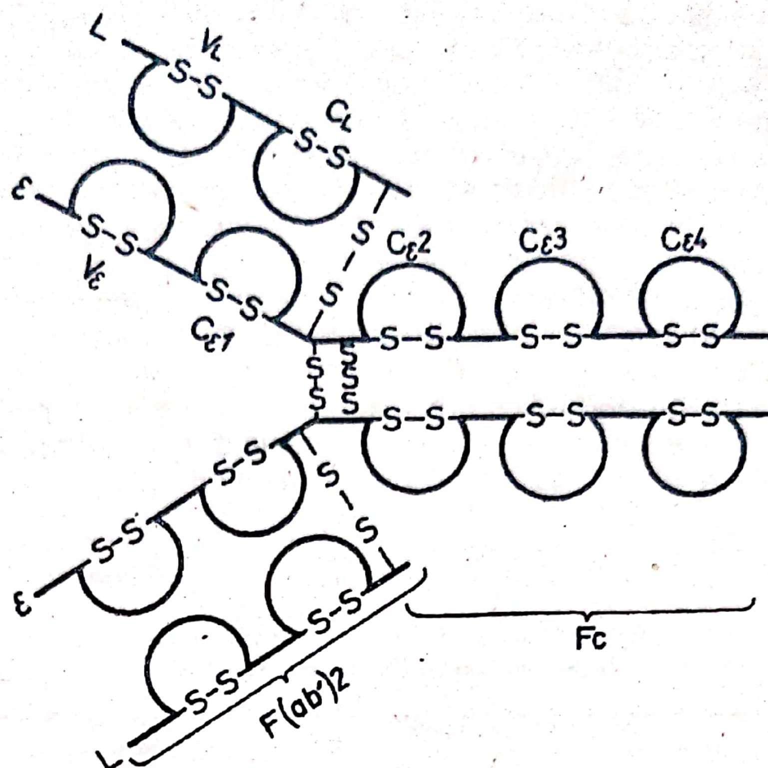



Fig.77. Structura moleculei IgE. Lanţurile grele au 4 domenii constante (Cε1, Cε2, Cε3, Cε4).

membrana mastocitelor, bazofilelor, inducând degranularea acestora şi eliminarea de amine vasoactive. A fost emisă ipoteza că în ser se găsesc cantităţi atât de mici de molecule IgE din cauză că ele se fixează citofil pe membrana acestor celule, devenind oarecum molecule "fixe", fixare care se face printr-un "situs de legare" situat la nivelul domeniilor *C ε*3 - *C ε*4.

La oamenii normali, se pot fixa pe suprafaţa bazofilelor cca. 10 000-40 000 de molecule IgE, cifră care la bolnavii atopici poate ajunge până la valoarea de 500 000. Legarea se face şi la receptorii de pe limfocite şi monocite, dar afinitatea de legare în aceste cazuri este mult mai mică decât cea care se realizează în cazul bazofilelor şi mastocitelor. Practic, moleculele de IgE se fixează prin fragmentul *Fc* la receptorii *Fcε* de pe aceste celule, situaţie care nu modifică cu nimic starea celulei respective. În momentul în care în organism pătrunde un alergen care este recunoscut specific ca antigen de către anticorpii IgE fixaţi citofil, se transmit semnale la celulă care eliberează imediat, în cantităţi mari, amine vasoactive de genul histaminei, serotoninei etc., care vor provoca contractura muşchilor netezi, vor mări permeabilitatea vaselor sangvine, generând simptomatologia tipică a hipersensibilităţii de tip imediat sau de tip I. Ca şi celelalte molecule de Ig, moleculele de IgE sunt secretate de către plasmocite sub controlul limfocitelor *Th* şi *Ts*, acţiunea reglatoare a acestora tinzând să limiteze durata şi intensitatea răspunsului prin aceşti anticorpi. De regulă, răspunsul cu IgE este precoce, apărând imediat după IgM şi înainte de IgG, producerea lor putându-se însă prelungi luni sau chiar ani de zile. Această prelungire explică persistenţa riscului anafilactic şi durata lungă a manifestărilor alergice. Factorii genetici sunt fundamentali în determinarea nivelului seric al acestei clase de imunoglobulină. De asemenea, limfocitele *Ts* au un rol important în reglarea sintezei lor.

Evaluarea cantitativă a nivelului seric al Ig este fără îndoială utilă, deoarece poate furniza informaţii privind o parte din potenţialul de răspuns imun al organismului, şi anume, cel al imunităţii umorale. Valorile excesiv de crescute sau de scăzute semnalează existenţa unor hiperimunoglobulinemii (proteine-mielom) sau hipoimunoglobulinemii. Dar, în activitatea curentă a laboratoarelor clinice, este bine de interpretat cu prudenţă semnificaţia rezultatelor obţinute, deoarece "limitele normale" ale concentraţiilor de imunoglobuline în ser se încadrează în nişte graniţe foarte "elastice". Ele sunt influenţate de o serie de factori de mediu, cum ar fi alimentaţia, temperatura mediului ambiant, sau de alţi factori ca de pildă existenţa unor endemii, vaccinări, infecţii localizate la nivelul unui organ sau sistemice etc. După cum rezultă din tabelul 43, aceste valori sunt condiţionate nu numai de localizările geografice, care au specificul lor în ce priveşte influenţa mediului ambiant şi a condiţiilor socio-economice, dar şi de timp, existând modificări periodice care deplasează într-un sens sau altul "valorile medii".

*Tabelul 43*

**"Limite normale" ale unor clase de imunoglobuline existente la populaţia adulţilor aparent sănătoşi**

| Clasa Ig | A | | B | | C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | U.I./ml | mg % | U.I./ml | mg % | U.I./ml | mg % |
| IgG | 100 - 200 | 800 - 1600 | 99 - 250 | 800 - 2000 | 120 - 250 | 960 - 2000 |
| IgA | 70 - 250 | 100 - 360 | 63 - 320 | 90 - 450 | 90 - 290 | 128 - 420 |
| IgM | 100 - 200 | 84 - 170 | 70 - 330 | 60 - 280 | 120 - 300 | 90 - 240 |
| IgD | ? | ? | 100 | 0,3 - 30 | 70 - 85 | 1 - 12 |

A=limitele valorilor considerate a fi normale la populaţia Europei Occidentale; B="limitele valorilor normale" în populaţia ţării noastre în anul 1986; C="limite normale" în ţara noastră în 1990.

După cum se poate observa din tabel, uneori diferenţele între limitele inferioare şi cele superioare sunt foarte mari, astfel că, atunci când la un pacient se înregistrează o valoare care depăşeşte cu puţin limita superioară sau este cu puţin sub limita inferioară, diagnosticul de hiper- sau hipogammaglobulinemie este mai mult decât hazardat. Sunt semnificative rezultatele care au cifre extrem de mici sau mari, dar nu cele care sunt la limite discutabile.

**Specificitatea alotipică a moleculelor de imunoglobuline** defineşte caracterul antigenic particular al acestora, apărut la un grup de indivizi din cadrul aceleiaşi specii, ca urmare a unor modificări minore în secvenţa aminoacizilor de la nivelul regiunilor constante ale lanţurilor *H* sau *L*. Aceste molecule, atunci când sunt inoculate la alţi subiecţi aparţinând speciei respective, sunt recunoscute ca străine, generează răspuns imun prin anticorpi şi sunt eliminate ca orice alt antigen. Alotipia este expresia unui polimorfism în structura genelor care codifică pentru regiunile *C* ale lanţurilor *H* şi *L*, aşa că structurile alotipice vor fi prezente numai la nivelul domeniilor $C_H$ şi $C_L$ dar nu şi la nivelul celor $V_H$ sau $V_L$ (fig. 78). Poliformismul genetic de la nivelul moleculelor de ig. umană a fost descris pentru prima dată de către R. GRUBB în 1956, primul sistem alotipic cunoscut fiind sistemul Gm (gamma marker) de la nivelul lanţului $\gamma$ al Ig.

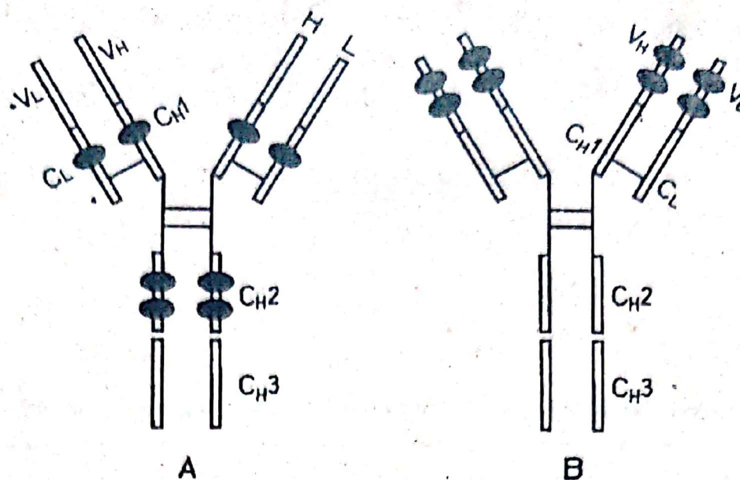



Fig.78. Poziţia markerilor alotipici (A) şi idiotipici (B) la nivelul moleculelor de imunoglobulină. Markerii alotipici sunt situaţi la nivelul domeniilor $C_L$ ale lanţului uşor şi $C_H1$, $C_H2$ ale lanţului greu. Markerii idiotipici sunt situaţi la nivelul domeniilor variabile ($V_H$ şi $V_L$), iar cei izotipici pe domeniile înalt constante ($C_H3$).

Se cunosc 5 tipuri de determinanţi alotipici:

1. Km sau markerii lanţului *L* κ (denumiţi anterior InV);
2. Gm sau markerii lanţului $\gamma$ (IgG);
3. Am sau markerii lanţului $\alpha$ (IgA);
4. Em sau markerii lanţului $\varepsilon$ (IgE);
5. IsF sau markerii lanţului $\gamma$1.

*Alotipiile Km* sunt dependente de alelele Km1, Km1,2 şi Km3 generate de modificarea intervenită în poziţia aminoacizilor de la nivelul poziţiilor 153 şi 191 (tabelul 44).

*Tabelul 44*

**Alotipiile Km şi distribuţia lor în populaţie**

| Alotipia | Aminoacizi existenţi în poziţia | | Frecvenţa în populaţie |
|---|---|---|---|
| | 153 | 191 | |
| *Km* 1,2 | Ala | Leu | Indienii din America de Sud |
| *Km* 1 | Val | Leu | Negroizi |
| *Km* 3 | Ala | Val | Caucazieni |

În cazul specificităţilor Km, este de obicei o unică substituire a unui reziduu de aminoacid din poziţia 191 a lanţului $L_k$, la nivelul regiunii constante *(C)* a acestuia. Dacă transpoziţionarea $C_k^{191}$ corespunde unei specificităţi alotipice, cea $C\ \lambda^{191}$ este o izotipie, adică provine din duplicarea unei gene, urmată de mutaţii care generează caracterele antigenice $0z^+$/ $0z^-$, precum transpoziţionarea C $\lambda$, determinantă caracteristică a izotipiei $Ker^+$/ $Ker^-$ care permite formarea celor trei tipuri de lanţ *L* $\lambda$ cu caractere antigenice diferite.

*Alotipiile Gm* sunt situate la nivelul domeniilor *C* $_{H}3$ ale lanţurilor grele ale subclaselor $IgG_1$ ($G_1m$), $IgG_2$ ($G_2m$) şi $IgG_3$ ($G_3m$ ). Sistemul Gm este foarte polimorf cunoscându-se până în prezent cca. 28 de alotipii; cea mai mare parte a

determinanţilor antigenici fiind, ca şi în cazul alotipiilor Km, epitopi condiţionaţi de structura terţiară a lanţurilor grele ale moleculelor IgG.

Subclasele IgG lipsite de markeri alotipici sunt notate nGm sau "izo-alotipice" (aceleaşi izotipii).

Sistemul Gm este util pentru caracterizarea unei populaţii pe baza markerilor săi genetici (tabelul 45).

*Tabelul 45*

**Markerii alotipici Gm exprimaţi predominant la grupe de populaţie**

| Grupa de populaţie | Markerii Gm |
|---|---|
| Caucazieni | Gm3, Gm5, Gm10, Gm11, Gm13, Gm14, Gm26, Gm27, Gm33 |
| Mongoloizi | Gm1, Gm17, Gm21, Gm26, Gm27, Gm28 |
| Negroizi | Gm5, Gm6, Gm10, Gm11, Gm13, Gm14, Gm24, Gm27 |

În sistemul Gm sunt cca. 28 de factori alelici exprimaţi pe diferite molecule IgG dar, ceea ce este foarte important de reţinut, aceşti factori nu sunt exprimaţi toţi pe aceeaşi moleculă. Dat fiind că este vorba de modificări de poziţie ale unui număr redus de aminoacizi, această modificare poate avea loc la un anumit izotip sau, altfel spus, la un lanţ care are o anumită secvenţă a aminoacizilor, caracteristică tuturor lanţurilor polipeptidice ale speciei respective din cadrul unei anumite clase de imunoglobulină. De exemplu, la IgG1, un reziduu Cys este înlocuit cu unul Arg la poziţia 214, motiv pentru care se instalează o schimbare a specificităţii antigenice, adică a specificităţii alotipice a lanţului respectiv. Aşa se explică şi relaţia strânsă care există între izotipie şi alotipie, adică între caracterele antigenice ale moleculelor de imunoglobulină specifice tuturor indivizilor unei specii şi particularităţile antigenice care definesc numai un grup de indivizi din cadrul acelei specii. În consecinţă, unele specificităţi vor fi prezente la unele subclase de imunoglobuline, iar altele, la alte subclase. De pildă, specificităţile Gm1 şi Gm17 sunt frecvente la subclasele IgG 1, cele Gm8 sau Gm23 la subclasa IgG2, cele Gm5 şi Gm21 la subclasa IgG3 etc. Numerotarea acestor specificităţi alotipice se face de regulă cu cifre arabe, deşi unii folosesc şi alfabetul latin (tabelul 46).

*Alotipiile A2m* . Pe lanţul $C\alpha 2$ al subclasei IgA2, dar nu pe $C\alpha 1$, sunt exprimate alotipurile A2m(1), A2m(2) şi izoalotipul nAm(2). Alotipul A2m(2) este frecvent exprimat la populaţia mongoloidă şi slab exprimată la negroizi.

Specificitatea *Am* se caracterizează prin lipsa reziduului Cys în poziţia 130, reziduu implicat în formarea legăturilor disulfidice (-S-S-) dintre lanţurile grele $\alpha$ 2 şi cele uşoare *(L)* ale moleculei $IgA_2$.. Din această cauză, aceste lanţuri sunt unite între ele nu prin legături disulfidice (-S-S-) ci prin legături de hidrogen (vezi fig. 73).

*Alotipul Em.* Singura specificitate cunoscută este Em(1) pe lanţul $\varepsilon$ al moleculei de IgE.

*Tabelul 46*

**Nomenclatura şi distribuţia alotipiilor imunoglobulinelor**

| Clasa sau subclasa de imunoglobulină | Domeniul | Terminologia | |
|---|---|---|---|
| | | Alfabetică | Numerică |
| IgG1 | $C_H3$ | G1m(a) | G1m(1) |
| | $C_H3$ | G1m(x) | G1m(2) |
| | $C_H1$ | G1m(f) | G1m(3) |
| | $C_H1$ | G1m(z) | G1m(17) |
| IgG2 | $C_H2$ | G2m(n) | G2m(23) |
| IgG3 | $C_H3$ | G3m(bo) | G3m(11) |
| | $C_H2$ | G3m(b1) | G3m(5) |
| | $C_H3$ | G3m(b3) | G3m(13) |
| | $C_H2$ | G3m(b4) | G3m(14) |
| | $C_H3$ | G3m(b5) | G3m(10) |
| | $C_H3$ | G3m(c3) | G3m(6) |
| | $C_H3$ | G3m(c5) | G3m(24) |
| | $C_H2$ | G3m(g) | G3m(21) |
| | $C_H2$ | G3m(u) | G3m(26) |
| | $C_H3$ | G3m(v) | G3m(27) |
| | $C_H3$ | G3m(s) | G3m(15) |
| | $C_H3$ | G3m(t) | G3m(16) |
| | $C_H3$ | G3m(g5) | G3m(18) |
| IgA2 | $C_H2$ | - | A2m(1) |
| | $C_H3$ | - | A2m(2) |
| IgE | ? | - | Em(1) |
| - | $C_L$ | | Km(1) |
| | $C_L$ | | Km(2) |
| | $C_L$ | | Km(3) |

*Specificitatea IsF* sau "Imunoglobulina San Francisco" este localizată pe lanţul greu al subclasei de molecule IgG1.

Deci, specificităţile alotipice definesc de regulă modificări în poziţia a 1-2 reziduuri de aminoacizi din secvenţa lanţurilor, modificări moştenite şi transmise conform legilor lui Mendel de segregare a caracterelor. Uneori însă, ele sunt dependente de transpoziţionarea unui singur aminoacid.

Dar nu numai modificările în poziţia aminoacizilor pot genera specificităţile alotipice. Acelaşi efect îl poate avea şi modificarea poziţiei unor hidraţi de carbon. Astfel, în cursul hemopatiilor sau grefelor de măduvă alogenă, se realizează o mare frecvenţă a fenotipurilor Km, probabil ca urmare a decapării unui grup de hidraţi de carbon de la nivelul aminoacidului situat în poziţia Km 123. Bineînţeles că, de multe ori, expresia serologică a multor specificităţi alotipice se datoreşte

structurii cuaternare a moleculei, în sensul că, prin torsionări particulare ale lanţului primar, sunt expuse la suprafaţa secvenţei de aminoacizi care în mod obişnuit rămân ascunse la moleculele de imunoglobulină ale indivizilor speciei respective.

În concluzie, alotipiile umane au fost puse în evidenţă pe lanţurile grele $\gamma1$, $\gamma2$, $\gamma3$, $\alpha2$ şi pe lanţurile $L_k$, dar nu pe lanţurile $\mu$ $\alpha1$şi $\delta$ sau pe lanţurile uşoare $L\ \lambda$.

În afară de om, bine cunoscute sunt specificităţile alotipice la şoarece şi la iepuri, care au fost descoperite încă din anul 1956 de către francezul J. OUDIN. De asemenea, există specificităţi alotipice şi la cobai, păsări, rumegătoare etc.

*Excluderea alelică.* Plasmocitele care secretă imunoglobuline suferă o "excludere alelică" atât pentru receptorii imunoglobulinici de suprafaţă cât şi pentru imunoglobulinele secretate. Ca urmare a acestui fenomen, fiecare celulă sintetizează o singură specificitate alotipică, celelalte fiind represate. De exemplu, dacă un plasmocit sintetizează specificitatea Km1,2 , adică dacă are reziduul Leu la poziţia 191 a lanţului $C_k$, atunci va avea supresată specificitatea Km3 în care, la poziţia 191 de pe $C_k$ se găseşte reziduul Val. Această inhibiţie funcţională a unui caracter antigenic, indusă de dominaţia altui caracter, se numeşte excluzie alelică şi poate fi întâlnită atât la nivelul unei singure celule sau clone celulare, cât şi la nivelul întregului organism. La nivelul unei celule sunt represate genele de pe cromozomul alelic, în organism putându-se însă găsi şi caractere codominante. De exemplu, există celule cu caracter dominant Gm1 şi celule cu caracter dominant Gm 25. În întregul organism, se pot însă găsi şi celule care exprimă ambele caractere, nici unul dintre ele nedominându-l pe celălalt. Deci, când este exprimat numai caracterul Gm1, atunci acesta îl domină pe Gm 25, sau invers, Gm 25 poate domina, adică poate exclude alelic pe Gm1, sau nu poate fi excluzie alelică şi atunci caracterele sunt codominante, fiind exprimate simultan. Poate fi şi situaţia în care este excluzie alelică la nivelul celulei pentru un caracter (de altfel aceasta este aproape o regulă) dar, la nivelul întregului organism, să existe celule care exprimă un caracter şi alte celule care exprimă alt caracter, astfel că, pe ansamblu, caracterele sunt "codominante". În cazul în care o clonă întreagă celulară este eliminată, atunci alela nu va mai fi prezentă şi va dispărea caracterul codominant. Această situaţie poate fi realizată experimental cu seruri anti-alotip. De exemplu, administrarea masivă de ser anti-alotip b4 la iepurele nou-născut, heterozigot b4/b5, suprimă expresia caracterului b4, alotipul b5 devenind dominant.

În general, evenimentele de recombinare care conduc la construcţia unei gene active a lanţului *H* sau *L* au loc numai pe unul dintre cei doi cromozomi alelici. Astfel, multe celule *B* sintetizează lanţurile *L* şi *H* ale uneia dintre cele două forme alotipice alternative, care este specificată de către genele ei alelice. Acest fenomen, adică exprimarea numai a unei alele în fiecare celulă, reprezintă efectul excluziei alelice. Încă nu se ştie dacă această excluzie este un proces activ, adică dacă recombinarea care are loc pe un cromozom inhibă recombinarea pe cromozomul alelic, sau este un proces pasiv, în sensul că evenimentul de combinare are o rată mai mare de erori, iar posibilitatea evenimentelor reuşite pe ambii cromozomi de pe aceeaşi celulă este foarte mică.

Există o anumită ierarhie în dezvoltarea recombinărilor. Astfel, la om, în linia limfocitară *B*, recombinările genei *H* preced pe cele ale genei k, care, la rândul lor, preced pe cele ale genei $\lambda$, astfel că ordinea este $H$ - k - $\lambda$. În acest fel, într-o celulă este exprimat un singur lanţ *L*. Consecinţa practică a acestor evenimente este aceea că fiecare celulă *B* exprimă receptori compuşi dintr-un singur tip de lanţ *L* şi o singură varietate de regiune variabilă a lanţului greu ($V_H$). Toate acestea

sprijină teoria selecţiei clonale, cel puţin la nivelul celulei *B* unde, deocamdată, fiecare progenitoare clonală exprimă anticorpi cu o specificitate de recunoaştere unică. Deci, prin excluzie alelică se asigură sinteza de către o singură celulă numai a moleculelor de anticorpi aparţinând unei clase, subclase şi alotip unic.

**Specificitatea idiotipică** a fost descoperită de către H.O.KUNKEL, J. OUDON şi L. MITCHEL, în anul 1963.

Prin specificitate idiotipică se înţelege caracterul antigenic particular pe care-l capătă molecula de anticorp care aparţine unui individ imunizat cu un anumit determinant antigenic. Deci, această specificitate este expresia modificărilor sterice de la nivelul *Fc* induse de către un anumit antigen, de unde şi localizarea ei numai în regiunile $V_H$ şi $V_L$ ale lanţurilor moleculei. Cu alte cuvinte, dacă un individ este imunizat cu un epitop oarecare, să zicem Z, moleculele de tip Ig anti-Z vor avea *Fc* de o conformaţie complementară epitopului Z, conformaţie care, la rândul ei, este recunoscută ca non-proprie de către alte limfocite ale organismului propriu, care vor sintetiza anticorpi pentru a o elimina. Această conformaţie sterică specifică antigenului Z se numeşte *specificitate idiotipică* ce, după cum spuneam, este situată numai la nivelul regiunii variabile a moleculei, deci la extremitatea $NH_2$ a $V_H$ şi $V_L$. Dacă un iepure, de exemplu, este imunizat cu un antigen dat, iar moleculele lui de IgG anti- acest antigen sunt păstrate *in vitro*, iar după un anumit timp, când titrul anticorpilor scade, i se inoculează propriile lui molecule, el va recunoaşte ca străin partea din situsul combinativ complementară antigenului şi va produce anticorpi faţă de ea. Deci, va produce anticorpi anti-idiotipici, fiecare ser anti-idiotipic precipitând doar serul cu specificitate idiotipică proprie. Dacă, de exemplu, mai mulţi iepuri sunt imunizaţi cu un anumit polizaharid, iar serurlle lor anti- polizaharidul dat sunt folosite pentru hiperimunizarea altor iepuri în vederea obţinerii de seruri anti-idiotip, aceste seruri vor reacţiona numai cu serurile cu care au fost imunizate animalele, respectiv dacă iepurele nr.2 a fost imunizat cu serul anti-polizaharid al iepurelui 5, el va precipita numai serul iepurelui 5, nu şi cel al altor iepuri, cu toate că toţi au răspuns cu anticorpi anti-acelaşi determinant antigenic. Deci, specificitatea anti-idiotip dezvoltă reacţii omoloage. Dar, în funcţie de epitopul folosit, se cunosc şi reacţii heterologe în care un ser antiidiotip reacţionează cu seruri imune provenite de la alţi indivizi imunizaţi cu acelaşi antigen. Este cazul iepurilor imunizaţi cu streptococi, cu *Salmonella abortus* etc. Aceasta demonstrează pe de o parte că specificitatea idiotipică poate cuprinde o arie restrânsă sau mai puţin restrânsă din suprafaţa situsului combinativ, iar pe de altă parte, că ea nu se transmite ereditar, după legi genetice simple, aşa cum este cazul celei alotipice. Idiotipia anticorpilor se caracterizează prin aceea că aparţin diferitelor clase de Ig (IgM, IgG etc.), apar în diferite stadii ale imunizărilor şi au funcţii diferite faţă de antigene.

În cursul unei imunizări, de exemplu, fie că sunt sau nu sunt întrerupte inoculările, idiotipia poate să apară sau să dispară. De exemplu, determinanţii antiidiotipici ai anticorpilor anti-paraaminobenzoat sunt înlocuiţi cu alţii pe parcursul imunizărilor. Sunt frecvente cazurile când, la o sângerare a animalelor imunizate, pentru recoltarea de ser imun, se constată existenţa unei reacţii idiotip-antiidiotip, pentru ca la sângerarea următoare această reacţie să nu mai fie prezentă din cauza dispariţiei specificităţii idiotipice respective.

Se pare că aceeaşi specificitate idiotipică se instalează numai în condiţia în care determinismul antigenic este purtat de aceeaşi moleculă, adică este legat la aceeaşi grupare purtătoare. Numai în aceste condiţii se poate instala secvenţa evenimentelor care duc la sinteza anticorpilor şi de care depinde specificitatea idiotipică, de unde concluzia că intervenţia moleculei ca un tot întreg este un

eveniment esenţial în formarea anticorpilor. Şi în cazul specificităţilor idiotipice este cunoscută *supresia* idiotipică. Şoarecii inoculaţi neonatal cu un ser anti-un anumit idiotip nu mai sintetizează anticorpi cu această specificitate; moleculele de Ig îşi păstrează funcţiile de anticorpi, dar cu alte specificităţi idiotipice. Specificităţile idiotipice sunt implicate în mecanisme de reglare a răspunsului imun (vezi teoria reţelei) şi, pe baza lor, se fac încercări de obţinere a unor vaccinuri în care să se folosească, în locul unor virusuri sau bacterii, anticorpi antiidiotip din generaţia a doua, care au conformaţia identică epitopilor respectivi şi care pot induce reacţii imune identice cu cele induse de agenţii infecţioşi respectivi, dar fără pericolele pe care le conferă manipularea acestora.

**Afinitatea şi aviditatea anticorpilor** se referă la forţa de recunoaştere şi legare a antigenului de către un singur situs combinativ sau de către toate situsurile combinative ale moleculei.

Afinitatea intrinsecă este forţa de atracţie dintre un singur situs combinativ şi un singur epitop, respectiv constanta de asociere K. Reacţia antigen-anticorp fiind reversibilă, în situaţia de echilibru valoarea constantei K este dată de relaţia

$$K=\frac{HS}{HixL}, \text{ în care:}$$

H = concentraţia haptenei monovalente legate;
S = concentraţia situsului combinativ care a legat haptena H;
Hi defineşte concentraţia haptenei libere, nelegată;
L = concentraţia situsurilor combinative libere care nu au fixat haptena.

Practic, valoarea constantei de afinitate K se determină prin măsurarea concentraţiei haptenei libere şi a celei legate, în situaţia de echilibru. Determinările se fac într-un sistem format dintr-o populaţie dată de anticorpi cu o anumită specificitate şi o populaţie de haptene. Se măsoară concentraţia haptenei libere şi a celei legate în situaţie de echilibru, fie prin procedeul "echilibrului de dializă", fie prin metode de "stingere a fluorescenţei" (fig. 79). În echilibru de dializă, două soluţii, dintre care una cu anticorpi şi alta cu haptenă, se găsesc într-un vas despărţit de un perete format dintr-o membrană de dializă. După atingerea echilibrului, se măsoară haptena care a fost marcată fie prin colorare, fie radioactiv, rămasă în partea de vas în care a fost introdusă la începutul experienţei, şi se calculează cantitatea de haptenă legată prin scăderea haptenei libere totale din cantitatea iniţială. În acest mod de determinare, se pot folosi şi anticorpi nepurificaţi, respectiv poate fi folosit serul imun ca atare.

Tehnica fluorescenţei se bazează pe proprietatea triptofanului de a emite o radiaţie de fluorescenţă cu o undă de 340-350 nm. Când situsul combinativ este ocupat de haptenă, se înregistrează stingerea maximă a fluorescenţei. Tehnica implică folosirea de anticorpi purificaţi şi este aplicabilă unui număr redus de haptene (care sunt bogate în triptofan).

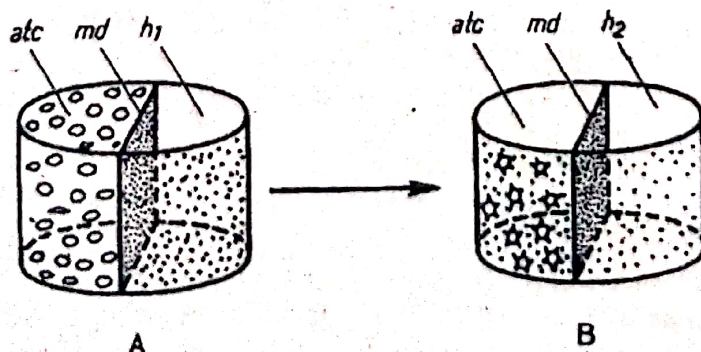



Fig.79. Principiul metodei "echilibrului de dializă". În vasul A, despărţit prin membrana de dializă *md* în două compartimente diferite, se găsesc: într-un compartiment epitopii marcaţi (*h*1), iar în altul anticorpii (*atc*). După realizarea echilibrului (B), se calculează cantitatea de epitopi legaţi specific de către anticorpi, scăzându-se (din cantitatea iniţială de $h_1$ din compartimentul cu epitopi) cantitatea rămasă ($h_2$).

Afinitatea intrinsecă este condiţionată de doza de antigen şi de durata de imunizare. La doze mari de antigen, sunt selecţionate molecule cu afinitate mică, iar la doze mici, molecule cu afinitate mare. La fel, prelungirea timpului de imunizare selectează moleculele de anticorpi cu afinitate mică.

*Aviditatea anticorpilor*, sau *aviditatea funcţională,* defineşte forţa de atracţie dintre toate situsurile combinative ale unei molecule de anticorpi şi un antigen complex. Cu cât anticorpul are mai multe valenţe, adică mai multe situsuri combinative, cu atât aviditatea va fi mai mare. De exemplu, un anticorp bivalent leagă un epitop de 100 de ori mai intens decât un singur situs combinativ, iar unul cu 10 situsuri combinative are o aviditate de 20 de ori mai mare decât unul bivalent. În fond, aviditatea ar putea fi definită şi ca "suma afinităţilor intrinsece ale unei molecule de anticorp". Prin implicarea mai multor situsuri combinative în legarea unui antigen complex, se antrenează o energie de legare crescută, stabilitatea complexelor crescând semnificativ. Aceasta are o mare importanţă biologică, aşa explicându-se de ce primii anticorpi care apar sunt pentavalenţi, cu 10 situsuri combinative, din clasa IgM. Ei fixează "ireversibil" virusurile sau bacteriile, preluând, până la apariţia altor clase de anticorpi, toate funcţiile de apărare umorală.

**Molecule omogene de imunoglobuline.** Caracteristica majoră a moleculelor de imunoglobuline este eterogenitatea funcţiilor lor de recunoaştere a antigenelor şi, bineînţeles, eterogenitatea lor structurală, condiţionată de destinaţia funcţională a lor. Dar, există şi situaţii în care populaţia moleculară a imunoglobulinelor este omogenă, atât din punct de vedere al potenţialului şi specificităţii de recunoaştere, cât şi din punct de vedere structural. Această omogenitate este prezentă uneori la moleculele normale de imunoglobulină sau la cele patologice. Ea poate fi generată natural, sau realizată de către om prin hibridoame celulare.

*Imunoglobuline omogene normale.* Omogenitatea moleculelor normale de Ig este condiţionată de către doi factori, şi anume, de natura antigenului şi de modul de proliferare a clonei stimulate. De exemplu, structura particulară a antigenelor timo-independente permite stimularea unei clone unice de limfocite *B* care vor sintetiza molecule de anticorp cu un înalt grad de omogenitate. Este cazul polizaharizilor pneumococici (S III) formaţi din simple unităţi repetitive care induc formarea de anticorpi omogeni în concentraţie ridicată, similari celor din proteinele mielom. În funcţie de modul de proliferare a clonei de limfocite stimulată se cunosc proteinele mielomatoase cu activitate de anticorp şi anticorpii monoclonali obţinuţi *in vitro* prin fuzionarea unui limfocit cu o celulă neoplazică.

Proteinele mielom apar în cazul proliferării neoplazice a unei clone de limfocite care secretă anticorpi cu o specificitate unică faţă de un anumit determinant antigenic. În afară de apariţia lor spontană, au putut fi induse şi experimental prin inocularea la şoarece de uleiuri minerale. Au fost obţinute aşa-zisele proteine mielom MOPC (Mineral Oil Plasmacitomas Cells), caracterizate prin sinteza de diverse molecule de anticorpi cu specificităţi diferite. Deoarece aceste proliferări neoplazice sunt transplantabile, au putut fi obţinute cantităţi mari de proteine mielom cu ajutorul cărora s-au putut determina secvenţa aminoacizilor din lanţurile Ig, funcţiile moleculelor şi fragmentelor de moleculă etc. De exemplu, proteina mielom MOPC 603 este o tumoră care secretă IgA de şoarece cu funcţie de anticorp anti-fosforilcolină. Cu ajutorul acestor molecule s-a putut studia structura fragmentului *Fab.* La om, au fost identificate diverse proteine mielom, care au permis descoperirea existenţei claselor şi subclaselor de imunoglobulină.

– *Anticorpii monoclonali* sunt de fapt o variantă *in vitro* a proteinelor de mielom, deoarece şi într-un caz şi în celălalt este vorba de proliferarea unei singure clone

de limfocite care secretă anticorpi cu o anumită specificitate. În principiu, metoda constă din fuzionarea prin diverse mijloace ( virus Sendai, polietilenglicol etc.) a unui limfocit cu o celulă neoplazică. Limfocitul aduce ca "zestre" funcţia sa secretorie de anticorp şi enzima hipoxantinfosforibozil-transferaza care catabolizează hipoxantina, iar celula neoplazică aduce capacitatea de multiplicare şi proliferare intensă. După fuzionarea celor două celule (fuzionează cca. o celulă din 1 000 de celule), se adaugă în mediul de cultură hipoxantină, aminopterină şi timină (mediul HAT) care vor omorî celulele mielomatoase cu deficit în hipoxantinfosforibozil-transferază. Celulele normale, care nu au capacitatea de multiplicare a celor neoplazice, mor în cursul pasajelor următoare, rămânând viabile numai celulele fuzionate care au moştenit atât capacitatea de proliferare cât şi cea de catabolizare a hipoxantinei. Acestea sunt dispersate în plăci cu godeuri distribuindu-se câte o singură celulă în fiecare godeu. După timpul necesar proliferării celulei, deci proliferării unei clone celulare, se determină natura anticorpului sintetizat şi eliberat în mediu de cultură. Se selectează clona dorită care se multiplică în continuare *in vitro*, după care se inoculează intra-peritoneal la şoarece unde se va înmulţi şi va sintetiza anticorpi cu specificitate de recunoaştere unică, deoarece provin dintr-o clonă unică, adică dintr-o populaţie de limfocite generată de către o singură celulă (fig. 80). Şoarecii la care se inoculează clona de celule fuzionate trebuie să fie consangvini, adică identici din punct de vedere genetic cu cei de la care provin celulele fuzionate. În caz contrar, ei vor respinge aceste celule recunoscându-le ca străine de organismul lor, adică non-proprii. De la un şoarece se pot recolta zilnic până la 20 de mg de proteină / ml de lichid ascitic. Dacă se ţine cont că zilnic se pot recolta câte 2-10 ml de lichid, atunci este lesne de realizat cât de eficientă şi bogată în randament este această metodă.

Au fost obţinuţi anticorpi monoclonali faţă de diverşi epitopi de pe membrana limfocitelor, cu ajutorul cărora s-a realizat în mare măsură "inventarul" antigenic al acestora, faţă de diferite componente chimice, antigene de origine animală, vegetală etc. În afară de utilizarea lor în cercetare, se încearcă şi introducerea în practica medicală clinică, în special în imunoterapia antitumorală şi antivirală nu însă fără a se întâmpina o serie de dificultăţi. Dacă producţia lor *in vivo* pe şoarece este simplă, folosirea omului în acest scop este imposibilă, deoarece este greu de imaginat ca cineva să accepte să fie inoculat intraperitoneal cu hibridoame pentru a deveni "producător" de lichid de ascită. Pe de altă parte, inocularea repetată a anticorpilor monoclonali de origine murină la om, deci inocularea unor produse xenogène, stimulează răspunsul imun al gazdei şi neutralizează produsul inoculat. Pentru depăşirea acestei dificultăţi, s-a încercat obţinerea de "anticorpi himerizaţi", nişte hibrizi formaţi din regiunile variabile *(Fab)* murine şi cele constante *(Fc)* umane sau, mai corect spus, alcătuirea unei molecule formate din $V_H$ şi $V_L$ murine asociate la $C_L$ şi $C_H1$, $C_H2$, $C_H3$ umane (fig. 81). Dar, s-a constatat că şi aceşti hibrizi sunt imunogeni, răspunsul imun faţă de domeniile variabile murine din molecula hibridă fiind destul de puternic. De aici necesitatea ca anticorpii monoclonali să fie "umanizaţi" adică să posede toată molecula de IgG uman cu excepţia celor 6 domenii hipervariabile de complementaritate (CDR) de la nivelele $V_L$ şi $V_H$ ale anticorpilor monoclonali murini care se introduc între secvenţele cadru *(Fr)* ale regiunilor hipervariabile umane (fig.82). Dar şi aceşti anticorpi "umanizaţi" ridică unele probleme, în sensul că au o afinitate de legare foarte scăzută, probabil datorită distorsionării regiunilor hipervariabile CDR murine de către regiunile cadru *(Fr)* umane, între care au fost inserate.

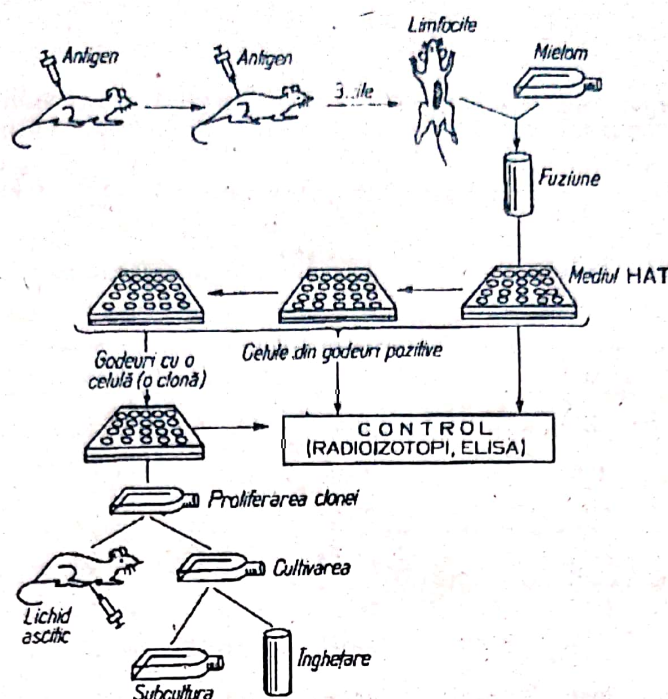



Fig.80. Principiul obţinerii anticorpilor monoclonali. Limfocitele *B* de şoarece, stimulate antigenic cu un anumit epitop, sunt fuzionate cu celule mielom. După dispersia celulelor în plăci cu godeuri, având-se grijă ca în fiecare godeu să fie o singură celulă hibridată, se identifică populaţia de celule fiice rezultată care, derivând dintr-o singură celulă, vor secreta anticorpul dorit, cu specificitate pentru un singur epitop.

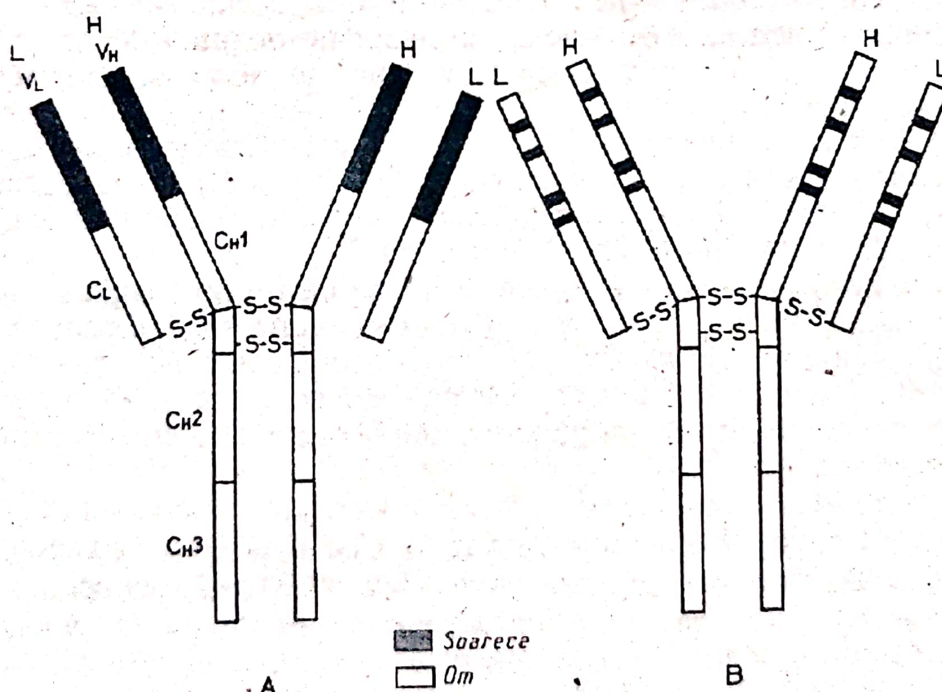



Fig.81. Anticorpi monoclonali "himerizaţi". La domeniile constante ale moleculei de IgG umană se "grefează" domeniile variabile ale moleculei de IgG murină cu specificitate de recunoaştere pentru anticorpul dorit. Această "grefare" poate fi realizată cu întreaga secvenţă a domeniilor $V_L$ şi $V_H$ (A) sau numai cu "regiunile CDR de determinare a complementarităţii" (B). În acest mod, se conferă funcţie de anticorp cu specificitatea dorită fără riscul eliminării moleculei din cauza faptului că are altă structură izotipică (după Man Sung Co şi C.Queen).

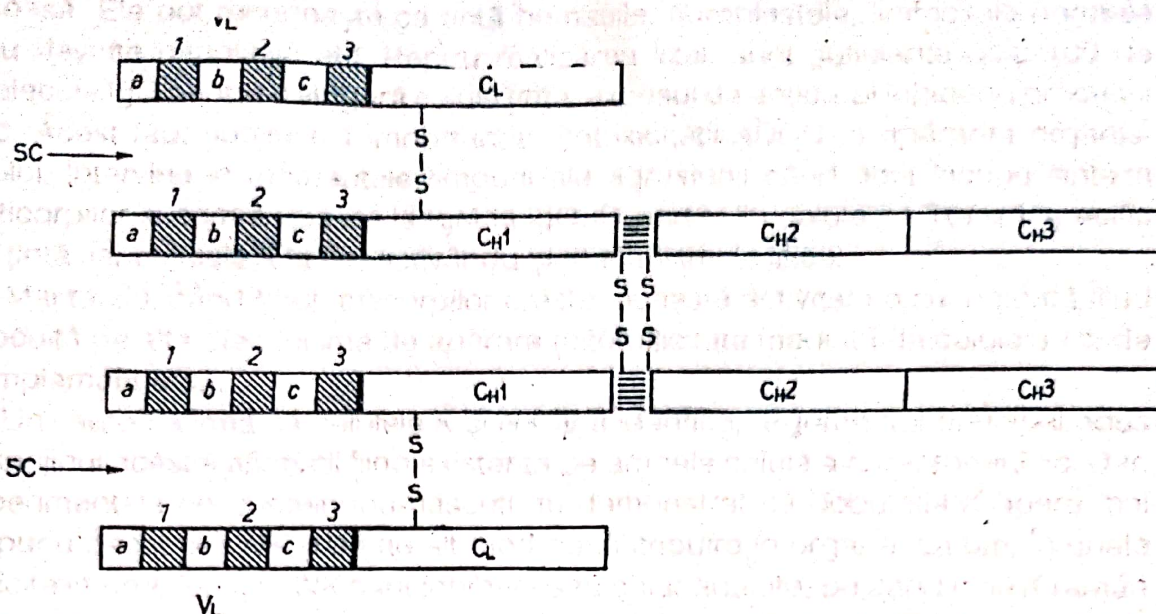



Fig.82: Anticorpi monoclonali "umanizaţi" (Vezi varianta "B" de la fig. 81). Sunt reţinute în moleculă numai regiunile CDR de origine murină, restul moleculei fiind de origine umană (după G. Winter şi W.J. Harris).

Există speranţa că, prin tehnologia ADN recombinat, în viitorul apropiat va fi posibilă obţinerea de anticorpi monoclonali cu molecule aparţinând în totalitate specificităţii izotipice umane.

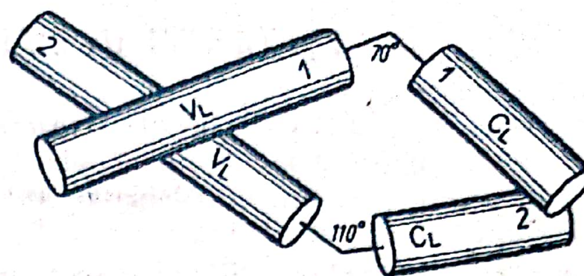
În prezent, sunt probleme legate nu numai de xenogenitatea lor, dar şi de preţ, de modul corect de stabilire a dozei terapeutice optime, de gradul lor de citotoxicitate, de prezenţa accidentală a unor virusuri etc. Cu toate aceste dificultăţi, anticorpii monoclonali au intrat în uz, nu numai în scop de cercetare sau de diagnostic, dar şi în scop terapeutic. Sunt tot mai mult utilizaţi în terapia unor boli infecţioase (anti-virus herpetic, virusul Rous etc.), a unor boli autoimune (anticorpi anti-*CD*3, *CD*4, ICAM-1, LFA-1, anti-*CD*25 etc.) sau neoplazice (anti-CEA, *CD*w52 etc.), perspectiva extinderii utilizării lor fiind certă.

*Imunoglobuline omogene patologice.* În multe cazuri de afecţiuni limfoproliferative pot să apară în circulaţie cantităţi mari de lanţuri *L* sau *H* incomplete, sau unite în fragmente anormale, similare prin modul lor de sinteză proteinelor mielom. Dintre acestea, mai cunoscute sunt proteinele Bence-Jones şi fragmentele de lanţuri $\alpha$, $\delta$, $\mu$ identificate în sângele sau urina pacienţilor cu mieloame sau limfoame maligne.

– *Proteinele Bence-Jones* , cunoscute încă din secolul trecut, sunt dimeri de lanţuri $L_k$ sau $L\lambda$ cu greutatea moleculară 15 000, eliminate în urina bolnavilor cu mielom sau macroglobulinemie, care precipită la 50-60°C în *p*H acid (4-6), se redizolvă prin încălzire la 80-90°C şi reprecipită prin răcire. Sunt proteine omogene, sintetizate de către limfocite maligne aparţinând unei singure clone. Lanţurile sunt fie k fie $\lambda$, în dimerul format un lanţ *L* jucând rolul lanţului *H*, iar celălalt lanţ *L*, rolul lanţului *L* din fragmentele *Fab* normale (fig. 83).

Diferenţele majore în conformaţia celor două monomere *L* se manifestă în relaţia spaţială între domeniile *C* şi *V*, un monomer având unghiul cu o deschidere de 70° ,iar celălalt, cu deschidere de 110°. În *Fab* normal, unghiul format de către $V_H$ şi $C_H$ este de 80-85° ,iar cel format de către $C_L$ - $V_L$ de 100-110°. Deci, lanţul *L*(1) este similar lanţului *H* din *Fab* normal, iar lanţul *L*(2), lanţului *L*. Segmentele

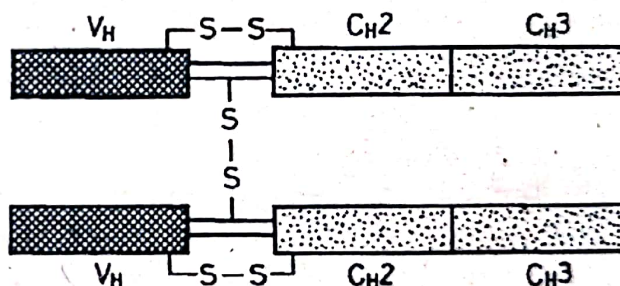
Fig.83. Molecula de proteină Bence-Jones. Lanţul L (1) ar avea rolul lanţului H din molecula normală de imunoglobulină, un pseudofragment Fab fiind format de $V_L$ al lanţului 1 şi $V_L$ al lanţului 2.




hipervariabile formează o cavitate lungă de 15Å şi largă de 20Å care ar reprezenta situsul combinativ, molecula având activitate de anticorp faţă de unele componente tisulare. Leagă moleculele mici de dimensiunile haptenelor, prin situsuri comparabile ca mărime şi poziţie cu situsul pentru fosforilcolină al *Fab* normal de şoarece. Dimerul Bence-Jones ar fi o imunoglobulină primitivă, cu o funcţie biologică, respectiv specificitate de anticorp necunoscută.

– *Lanţuri grele patologice*. În unele situaţii, sinteza lanţurilor *H* ale moleculelor de Ig se face incomplet, cu "pauze" în secvenţa normală a aminoacizilor. După înşiruirea primilor 12 - 20 de aminoacizi dinspre extremitatea $NH_2$ terminală a regiunii $V_H$, urmează înşiruirea resturilor din domeniile $C_H2$ şi $C_H3$ , regiunea $V_H$ legându-se direct prin "balama" de aceste domenii datorită inexistenţei domeniului $C_H1$. Au fost identificate lanţuri patologice $\delta$ şi $\alpha$ în limfomul malign al intestinului subţire la om, sau $\mu$ în unele stări patologice asociate şi cu sinteza proteinelor Bence-Jones. De regulă însă, la aceşti bolnavi, sinteza lanţurilor *L* este abolită, legăturile disulfidice intercatenare *H - L* stabilindu-se între cele două fragmente ale lanţului patologic (fig. 84) care are greutatea moleculară de cca. 40 kD în loc de greutatea normală de 52 kD.

Fig.84. Lanţuri grele patologice. Sunt lipsite de domeniile $C_H1$, domeniile $C_H2$ legându-se direct la cele $V_H$. Din această cauză lanţurile sunt rigide, iar moleculele formate sunt nefuncţionale.




## SINTEZA IMUNOGLOBULINELOR

Ca orice moleculă de proteină din organism, imunoglobulinele sunt sintetizate sub control genetic strict, anabolismul lor având caracteristici particulare. După ce îşi exercită funcţiile biologice, moleculele "îmbătrânesc" şi sunt degradate, fiind înlocuite cu altele tinere. Anabolismul şi catabolismul Ig sunt procese interdependente care realizează menţinerea homeostaziei în apărarea imună mediată umoral a organismului.

**Anabolismul moleculelor de anticorp.** După cum aminteam în capitolele precedente, sinteza imunoglobulinelor recunoaşte următoarele etape:

a. Sinteza lanţurilor polipeptidice;

b. Asamblarea moleculei;

c. Adiţia componentelor glucidice;

d. Polimerizarea şi eliminarea moleculelor de imunoglobulină;
e. Comutarea sintezei moleculelor de imunoglobulină.

Toate aceste procese sunt sub controlul genetic, atât din punct de vedere al sintezei lanţurilor, cât şi din cel al asamblării moleculelor.

**Controlul genetic al sintezei imunoglobulinelor** (Vezi capitolul "Determinismul genetic al funcţiilor imune").

**Catabolismul imunoglobulinelor.** Degradarea moleculelor de Ig, sau catabolizarea lor, exprimată ca "timp de înjumătăţire" (T 1/2) este un proces fiziologic care permite înlocuirea permanentă a moleculelor îmbătrânite cu altele tinere, cu meţinerea unui nivel constant al lor în organism. Există o relaţie direct proporţională între rata de catabolizare (K), concentraţia de Ig (A) şi timpul (T) exprimat în zile, relaţia fiind $K=\frac{A}{T}$, în care K este rata de catabolizare într-o singură zi. Deci T 1/2 este cu atât mai lung cu cât rata sa de catabolizare este mai mică.

Dar, în afară de rata de catabolizare, T 1/2 mai este dependent şi de clasa de Ig, de specia animală, de viteza de sinteză a moleculelor, respectiv de nivelul concentraţiei lor în ser etc. Pentru determinarea valorii acestui timp, moleculele sunt marcate radioactiv, de regulă cu $^{125}I$, după care se urmăreşte prezenţa izotopului în organism. Aşa s-a determinat că, la om, T 1/2 al IgM este de 5,1 zile, iar al IgG de 22 de zile. La şoarece, animal cu greutate corporală mică şi activitate metabolică intensă, T 1/2 al IgG este de numai 3,9 zile în timp ce, la animale cu greutate corporală mare, valoarea lui este mult mai mare. La hipergammaglobulinici, deci în exces de molecule de imunoglobuline, T 1/2 scade la jumătate faţă de valoarea normală (cca. 12 zile), iar la hipogammaglobulinici, creşte de aproximativ trei ori faţă de normal (cca. 70 de zile).

Catabolizarea claselor IgM şi IgA nu este influenţată de concentraţia lor în ser. Mecanismele care stau la baza catabolizării moleculelor de Ig nu sunt bine cunoscute, fapt pentru care au fost emise diferite ipoteze prin care se încearcă explicarea lor. O ipoteză, a "catabolizării selective", susţine că molecula de Ig, atunci când îmbătrâneşte, îşi modifică conformaţia devenind străină de organism. Acesta are preformaţi anticorpi care recunosc moleculele modificate, se combină cu ele, formând complexe care sunt fagocitate şi eliminate din organism de către celulele din seria fagocitar-macrofagică.

O altă ipoteză, a "receptorilor de protecţie", susţine că celulele din seria monocitară, sau unele celule epiteliale care catabolizează Ig au receptori de membrană pentru *Fc*. Celulele pot lega moleculele din ser fie direct, fie prin intermediul acestor receptori. Moleculele fixate la receptori sunt trecute prin filtrul celular şi eliminate extracelular fără a fi distruse de către celule. Moleculele nefixate, odată ajunse în celulă, în lipsa protecţiei pe care o conferă receptorii, sunt atacate de către "protein-disulfid-reductază", o enzimă care desface legăturile din lanţurile *H* sau dintre *H* şi *L*. Lanţurile, odată eliberate, devin susceptibile la acţiunea catepsinelor, care le vor descompune în continuare până la nivel de aminoacizi. Deoarece numărul receptorilor de pe suprafaţa membranei macrofagelor este fix, şi numărul moleculelor care pot fi protejate se menţine constant, rata de catabolizare devine cu atât mai mare cu cât creşte concentraţia acestora în ser. În această situaţie, un număr sporit de molecule nu mai găsesc receptori liberi, din care cauză se ataşează direct la membrana celulară.

Situsul de catabolizare a moleculelor de Ig, deci locul de la nivelul moleculei care face ca ea să fie recunoscută de către elementele de degradare ale organismului atunci când îmbătrâneşte, este situat la nivelul domeniului $C_H2$. Într-adevăr, rata de catabolizare a acestui domeniu este identică ratei de

catabolizare a moleculei întregi, dar este diferită de cea a domeniului $C_{H}3$ sau a fragmentului *Fab*. Acest situs este diferit de cel care determină legarea la suprafaţa celulei, el fiind doar "punctul sensibil" al moleculei, la care se ataşează enzima "protein-disulfid-reductază" care, odată activată, începe desfacerea ei. Locul de catabolizare a moleculelor în organism este incert. Se pare că un rol important din acest punct de vedere revine ficatului şi intestinului subţire, iar în cazul proteinelor Bence-Jones, rinichiului.

**Aplicaţiile practice ale anticorpilor.** Poate că prima aplicare practică a anticorpilor s-a făcut cu mult înainte de a se cunoaşte structura sau proprietăţile biologice şi funcţionale ale imunoglobulinelor. Transferul pasiv de ser imun sau hiperimun în sistem xenogen a permis, fără prea multe cunoştinţe de biochimie şi imunochimie, lupta împotriva unor boli infecţioase cu evoluţie acută. Seroterapia în difterie, tetanos, scarlatină sau rabie a salvat multe vieţi omeneşti, fapt care a făcut ca obţinerea de seruri imune sau hiperimune să devină o preocupare majoră pentru institutele de seruri şi vaccinuri din întreaga lume. În prezent însă, pe lângă utilizarea acestor seruri polivalente şi xenogene ca mijloace terapeutice care încă nu şi-au pierdut total importanţa, anticorpii sunt folosiţi într-o varietate largă de tehnici şi metodologii de diagnostic imunologic. Fiecare utilizare depinde în ultimă instanţă de existenţa unei surse acceptabile de producere a lor. La început, producţia "industrială" s-a făcut folosind cai, oi, iepuri, ca animale de elecţie pentru imunizări, care furnizau anticorpi policlonali ce prezentau însă unele neajunsuri, în sensul că aveau variabilitate de specificitate, conţineau şi alte proteine în afară de imunoglobuline şi erau imunogeni în cazul administrărilor *in vivo* la om. Acest fapt a impus găsirea altor metode, dintre care cea a anticorpilor monoclonali s-a dovedit a fi cea mai adecvată atât scopurilor terapeutice cât şi celor de diagnostic sau cercetare fundamentală.

Anticorpii se folosesc în scop de diagnostic şi cercetare într-o varietate de tehnici din ce în ce mai rafinate şi mai complexe. Este cazul tehnicilor de radioimunodozare, de imunoradiometrie, de dozări enzimatice (ELISA) etc. De asemenea, cu ajutorul lor se poate realiza, prin cromatografie de afinitate, purificarea proteinelor sau analiza peptidelor prin metoda "fazei reverse directe".

Sunt utilizaţi pentru identificarea unor substanţe prezente în ser sau urină, pentru detoxifierea organismului de astfel de substanţe, ca de pildă pentru eliminarea digoxinei în caz de intoxicaţii cu acest medicament, pentru terapia de urgenţă a unor infecţii grave, cu forme de bacteriemie sau septicemie, situaţii în care se inoculează fragmentele $F(ab')_2$ direct intravenos etc.

Există speranţa utilizării anticorpilor anti-idiotip $A_2$ ca antigene lipsite de inconvenientele antigenelor naturale, precum şi pentru utilizarea anticorpilor monoclonali ca "purtători" de agenţi distructivi pentru celula canceroasă.

## SISTEMUL COMPLEMENT

Complementul sau alexina este un sistem de factori cu multiple funcţii biologice (tabelul 47) care se găsesc într-o concentraţie relativ constantă în serul normal. Nivelul seric al acestor factori nu este influenţat de stimulii antigenici şi de gradul de activare a componentelor celulare ale sistemului imun, dar este influenţat de carenţele alimentare, în special de cele proteice şi de specia animalului. Serul normal de şoarece, de exemplu, are puţin complement, în timp ce în serul de cobai, iepure, nurcă etc. se găsesc cantităţi mari. Şoarecele este defectiv în componenta *C5* a complementului, iar porcul are mari cantităţi din componenta *C3*.

*Tabelul 47*

**Unele funcţii biologice ale complementului**

| Funcţii | Modul de exprimare a funcţiei |
|---|---|
| De apărare nespecifică | - Liza bacteriilor sau virusurilor<br>- Liza celulelor străine<br>- Activarea opsonică a fagocitozei (prin receptorii pentru complement)<br>- Activarea chemotactismului neutrofilelor şi macrofagelor<br>- Fixarea complexelor antigen-anticorp la membrana unor celule<br>- Activarea degranulării mastocitelor şi bazofilelor |
| Alte implicaţii fiziologice | - Creşterea permeabilităţii vasculare<br>- Contracţia muşchilor netezi |

## FUNCŢIA CITOLITICĂ A COMPLEMENTULUI

Întregul sistem este alcătuit din cca. 26 de componente organizate în 9 grupe, care în ser se găsesc în stare inactivă, dar pot fi activate enzimatic de către complexele antigen-anticorp ("calea clasică") sau de către diferiţi alţi factori cum ar fi moleculele mari, imunoglobulinele polimerizate, endotoxinele şi lipopolizaharizii germenilor Gram-negativi, pereţii levurilor (zimozan) etc. ("calea alternativă") . Activarea pe "cale clasică" este rapidă şi eficientă, în timp ce activarea pe "cale alternativă" sau "properdinică" este mai lentă şi mai puţin eficientă. Activarea "clasică" este expresia unor mecanisme specifice, pe când cea "alternativă" este o activare primitivă, nespecifică, căreia, la vertebratele inferioare în special, îi revine un rol major în apărarea antibacteriană. Şi una şi alta din aceste căi duc la liza celulelor străine, eukariote sau prokariote, ca urmare a disocierii lipidelor din membrană, cu alterarea ireversibilă a acesteia. Primul component, odată activat, declanşează o reacţie în "cascadă" inducând activarea următorului component şi aşa mai departe, în succesiunea *C* 1 - *C* 4 - *C* 2 - *C* 3 - *C* 5 - *C* 6 - *C* 7 - *C* 8 - *C* 9.

Componentele sunt numerotate în ordinea activării lor, cu excepţia *C* 4 care, deşi este pe locul doi în secvenţa de activare, are numărul 4 deoarece a fost descoperit şi descris după componentele *C* 2 şi *C* 3. Prin consens s-a convenit ca o linie neîntreruptă deasupra simbolurilor să semnifice activarea fragmentelor, iar literele după numere să semnifice formarea de fragmente ca urmare a scindării moleculelor inactive. De exemplu, *C* 3 este scindat în *C* 3a (inactiv) şi C 3b (activ enzimatic).

Componentele complementului sunt sintetizate atât de către macrofage şi monocite, care se pare că le folosesc pentru "uz propriu", cât şi de celulele hepatice, ca excepţia *C* 1, care ar fi sintetizată la nivelul epiteliului gastrointestinal şi urogenital.

Din punct de vedere funcţional, moleculele complementului pot fi împărţite în trei grupe: două realizează cascada de reacţii care vor activa *C* 3 (o grupă pentru calea clasică şi alta pentru cea alternativă) pentru ca, odată activată componenta

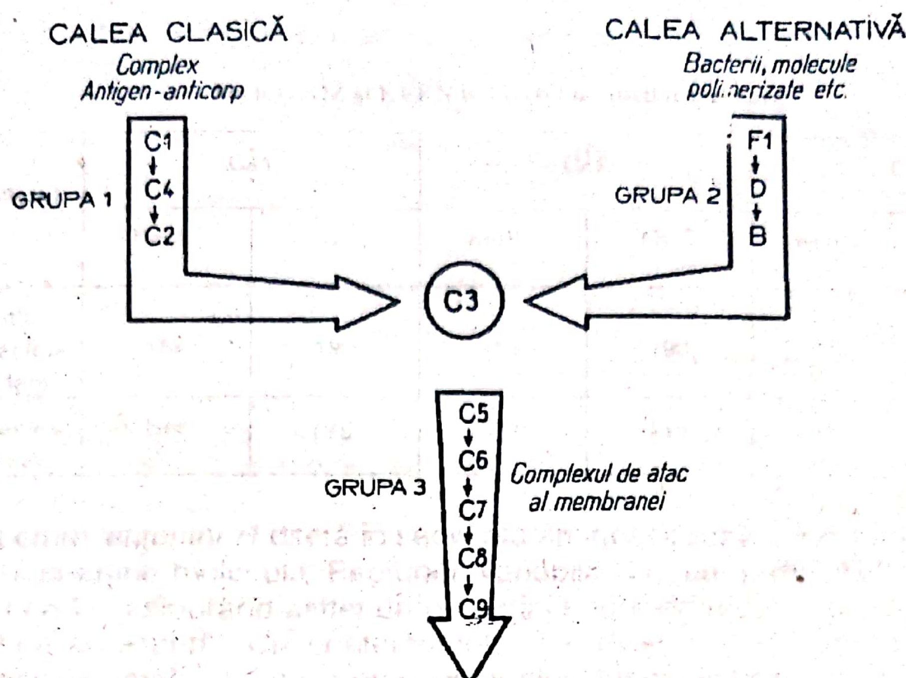



Fig.85. Secvenţele de activare a complementului prin căile "clasică" şi "alternativă". Ambele căi duc la activarea componentei C3 şi la antrenarea complexului de atac C5-C9.

C 3, să activeze la rândul ei moleculele celei de a treia grupe care vor realiza parte finală a funcţiilor citolitice formând "complexul de stac" al membrane celulare (fig. 85).

În mod normal, componentele complementului se găsesc sub formă de pr cursori inactivi care însă, după clivaj proteolitic limitat, se desfac în două sau ma multe fragmente active, dintre care un fragment minor, care de regulă nu este implicat în procesul de citoliză şi un fragment major implicat în acest proces. Fragmentul major poartă două situsuri: unul pentru ataşarea la membrana celulară şi altul pentru activarea enzimatică necesară clivării următorului component din secvenţa de activare (fig. 86). O parte din fragmentul major activat, cu funcţii

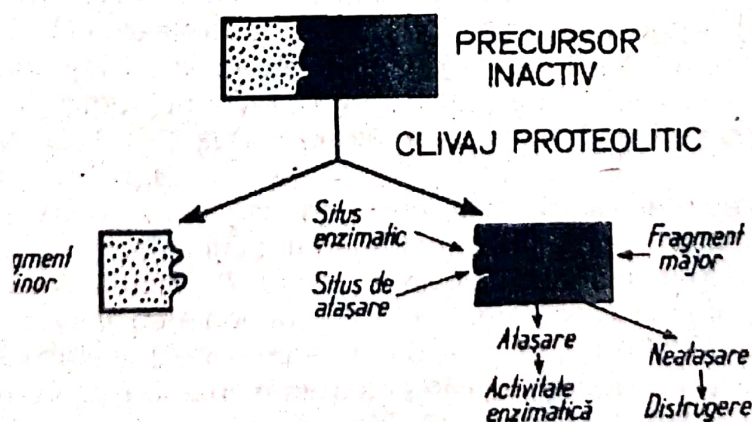



Fig.86. Principiul de bază al clivării componentelor complementului. Sub acţiunea proteolitică a unor enzime, precursorul inactiv este clivat în două fragmente: unul minor, cu activităţi biologice diferite, dar fără activitate enzimatică, şi altul major, cu activitate enzimatică şi cu posibilităţi de ataşare la pereţii celulelor străine. Dacă nu s-a ataşat este complet distrus, iar dacă s-a ataşat îşi desfăşoară activitatea enzimatică, activând un alt component existent până acum ca precursor inactiv (după M. Haeney).

enzimatice, se leagă la celulă şi devine activator pentru secvenţele ulterioare, pe când o altă parte, nefixată la peretele celular, este foarte rapid distrusă. În acest fel, este evitată generarea unor acţiuni nocive pentru organismul propriu.

În ambele căi, secvenţa evenimentelor se desfăşoară în trei etape diferite, şi anume: 1) recunoaşterea sau declanşarea secvenţei de iniţiere; 2) activarea enzimatică şi asamblarea complexelor de atac şi 3) formarea moleculei "ucigaşe" cu perforarea membranei celulei ţintă.

**Calea clasică de activare a complementului.** Moleculele de imunoglobulină, după ce au fixat antigenul, suferă modificări conformaţionale care "descoperă" situsul de legare a complementului de la nivelul domeniului *C* H2 al moleculei de IgG sau domeniului *C* H4 al moleculei de IgM, permiţând recunoaşterea de către acestea a complexului *C* 1 şi activarea cascadei de reacţii care vor sfârşi prin a liza membrana celulară. Nu toate moleculele de Ig pot activa complementul după ce au format complexe cu anticorpii, unele fiind inerte din acest punct de vedere (tabelul 48). Situsul pentru complement de pe molecula de Ig odată descoperit, leagă fragmentul *C* 1q din complexul proteic *C* 1. Acesta este format din trei subunităţi în formă de Y, fiecare subunitate fiind la rândul ei alcătuită din două părţi, în compoziţia fiecăreia dintre ele fiind trei lanţuri peptidice legate între ele prin legături disulfidice. Tot complexul, format din 18 lanţuri, are aspectul unui buchet de lalele (fig. 87). Extremitatea globulară, rezistentă la colagenază se leagă la situsul pentru complement de pe molecula de Ig, tija sensibilă la colagenază, în prezenţa $Ca^{2+}$ activează C1s şi C1r, iar porţiunea dintre tijă şi lanţul globular este un triplu helix de unire.

*Tabelul 48*

**Principalele clase şi subclase de imunoglobuline care pot lega eficient fragmentul *C* 1q al complementului**

| Specia | Clasa sau subclasa de imunoglobuline |
|---|---|
| Om | IgG1, IgG3, IgG2, IgM |
| Şoarece | IgG2a, IgM |
| Cobai | IgG2, IgM |
| Porc | IgG2, IgM |
| Rumegătoare | IgG1 |

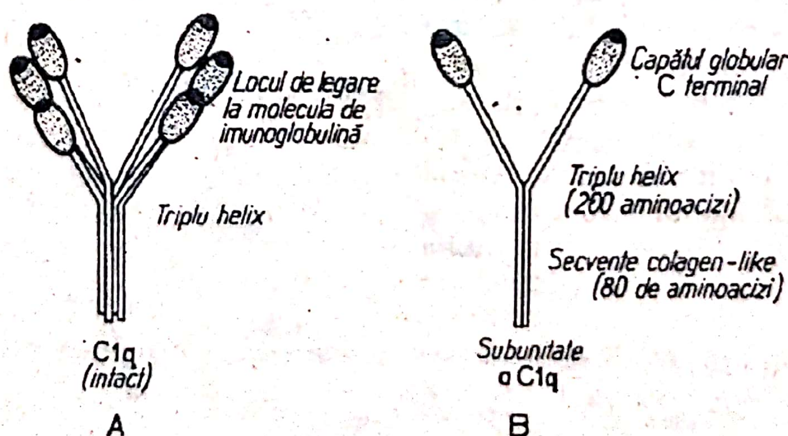



Fig.87. Aspectul fragmentului C1q intact (A) şi al unei subunităţi componente ale sale (B) (după I. Roitt şi col.)

Pentru legarea *C* 1q sunt necesare două situsuri, respectiv două fragmente *Fc* situate la o distanţă foarte apropiată (fig. 88). Din această cauză, complementul poate fi activat de către o singură moleculă de IgM care are înmănunchiate 5 fragmente *Fc*, dar nu şi de o singură moleculă IgG cu un fragment *Fc* unic.

După activare, *C* 1r şi *C* 1s sunt convertite în enzime proteolitice care vor hidroliza componentele *C* 4 şi *C* 2. Fragmentul *C* 1s scindează componenta *C* 4 într-un peptid minor,cu greutatea moleculară de 600 D, fragmentul *C* 4a şi un fragment major, *C* 4b. *C* 4b are afinitate pentru *C* 2 care este apoi scindat în fragmentele *C* 2a cu greutatea moleculară mică şi *C* 2b. Fragmentul *C* 2b în prezenţa $Mg^{2+}$ se leagă la fragmentul *C* 4b, formând complexul *C* 4b2b sau "convertaza clasică *C* 3", cu timpul de înjumătăţire de 5 minute la 37°C . Convertaza *C* 4b2b taie la capătul $NH_2$ terminal al lanţului componentei *C* 3 un fragment peptidic *C* 3a alcătuit din 37 de resturi de aminoacizi cu greutatea moleculară de cca. 9 000 D. Aminoacidul ultim de la extremitatea COOH terminală a fragmentului *C* 3a este arginina. În afară de fragmentul *C* 3a, inactiv enzimatic, dar cu marcante proprietăţi anafilactice, proteoliza convertazei *C* 3 mai formează un fragment mai mare, *C* 3b, care se leagă la convertaza *C* 4b2b formând complexul *C* 4b2b3b sau "convertaza clasică *C* 5" care va desface componenta *C* 5 în fragmentele *C* 5a şi *C* 5b. Fragmentul *C* 5a, cu 74 de resturi de aminoacizi şi, de asemenea, un rest de arginină la extremitatea COOH terminală, ca şi *C* 3a, nu are funcţii citolitice dar acţionează în reacţiile inflamatorii, fiind deci o "anafilotoxină" (cu o activitate mai slabă decât cea a fragmentului *C* 3a). Celălalt fragment, *C* 5b, se ataşează la membrana celulei ţintă, antrenând adiţia secvenţială a altor patru proteine - componentele 6, 7, 8 şi 9 - care, în raport molar direct şi corect, formează "complexul de atac al moleculei". Odată componentul *C* 5 clivat, celelalte secvenţe de atac se declanşează automat, fără alte activări enzimatice. Complexul *C* 5b6b este hidrofil dar, atunci când leagă şi componenta *C* 7, devine hidrofil şi hidrofob cu exprimarea unor grupe apolare care-i conferă proprietăţi de "detergent", solubilizator al lipidelor de membrană. În soluţie, complexul *C*5b6b7 are o existenţă foarte scurtă cu un timp de înjumătăţire de cca. 0,1 secunde. Dar, odată legat la membrană, devine stabil, polimerizează *C* 8 şi apoi *C* 9 care vor forma "instrumentele" de perforare ireversibilă a membranei. Sistemul complement, odată activat, continuă secvenţele activatoare sub regim automat până la con-

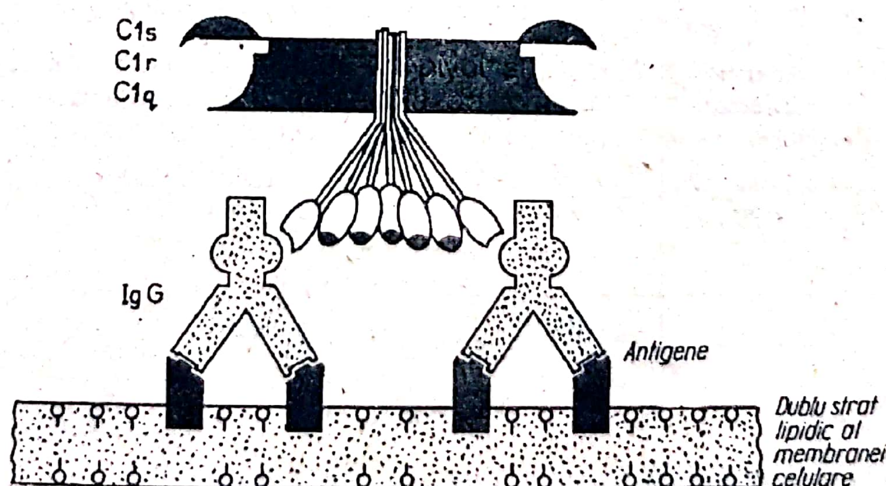



Fig.88. Modul de ataşare a componentei C1q la moleculele de IgG fixate specific pe membrana plasmatic a unei celule. Pentru ca C1q să fie activat, este necesară prezenţa a două fragmente Fc apropiate (după I. Roitt şi col.).

sumarea totală a componentelor sau fragmentelor sale, consumare care, de altfel, reprezintă şi una din modalităţile de control şi "frânare" a acestor funcţii. Activarea însă mai poate fi inhibată nu numai prin "epuizarea" fragmentelor datorită vieţii lor scurte, dar şi de intervenţia unor alţi factori. Este cazul "inhibitorului *C* 1", o esterază care blochează declanşarea activării încă de la nivelul complexului *C* 1. Inhibitorul se leagă la *C* 1q eliminând fragmentele *C* 1r şi *C* 1s sub formă de complexe *C* 1r - *C* 1s, blocând în acest mod posibilitatea activării componentelor *C* 4 şi *C* 2.

Un alt control este exercitat de către un factor inhibitor, denumit "factorul I". Acesta acţionează asupra fragmentului *C* 3b care scindează în continuare în fragmentele *C* 3c şi *C* 3d. Fragmentul *C* 3c este eliminat, iar *C* 3d rămâne ataşat la *C* 3b limitându-i activitatea enzimatică.

**Calea alternativă de activare a complementului.** Factorii de declanşare a cascadei evenimentelor activatoare ale componentelor complementului şi secvenţa de iniţiere a lor pe cale clasică sunt deci complexul antigen-anticorp şi complexul *C* 1 - *C* 4 - *C* 2. În cazul căii alternative, aceştia sunt înlocuiţi de proteine polimerizate, de endotoxine şi de factorul de iniţiere "FI". Acest factor activează o glicoproteină (factorul B) care competiţionează cu un alt factor, factorul H, pentru ocuparea unui situs comun pe fragmentul *C* 3b (tabelul 49). Odată B activat, se formează complexul *C* 3bB, care sub acţiunea enzimatică a unei globuline (factorul D) şi în prezenţa $Mg^{2+}$ pierde un fragment mic Ba, fragmentul mare rămânând ataşat la *C* 3b. Se formează complexul C3bBb (sau "convertaza solubilă *C* 3") care va activa componenta *C* 5 cu formarea complexului de atac, într-o manieră similară convertazei *C* 3 (*C* 4b2b) din calea clasică (fig 89). Polizaharizii, endotoxinele, pereţii levurilor etc., odată ajunse în ser, activează conversia componentei *C* 3 în fragment *C* 3b, care se va fixa la suprafaţa polimerului activator şi va ataşa cantităţi tot mai mari da factor B, care devine sensibil la acţiunea proteolitică a factorului D cu eliberarea de fragmente Ba şi Bb. Fragmentele mici Ba se pierd, iar cele Bb vor forma cu *C* 3b complexele *C* 3bBb instabile, complexe care se stabilizează prin captarea properdinei.

*Tabelul 49*

**Unele proprietăţi fizico-chimice ale factorilor intervin în activarea pe "cale alternativă" a complementului**

| Factorul | Greutate moleculară | Concentraţia în ser (mg/litru) | Modul de alcătuire a moleculei | Clivează în |
|---|---|---|---|---|
| FI (factor de iniţiere) | 170 | ? | Pseudoglobulină formată din două lanţuri polipeptidice | |
| B | 93 | 200 | $\beta$ 1-glicoproteină | - Ba, o $\alpha_2$-globulină de 30 kD<br>- Bb, o $\gamma$ -globulină de 63 kD cu afinitate pentru C3 |
| D | 24 | 1 - 5 | $\alpha$ - globulină formată dintr-un singur lanţ | |
| Properdina | 223 | 25 | Tetramer format din două unităţi complexe | |

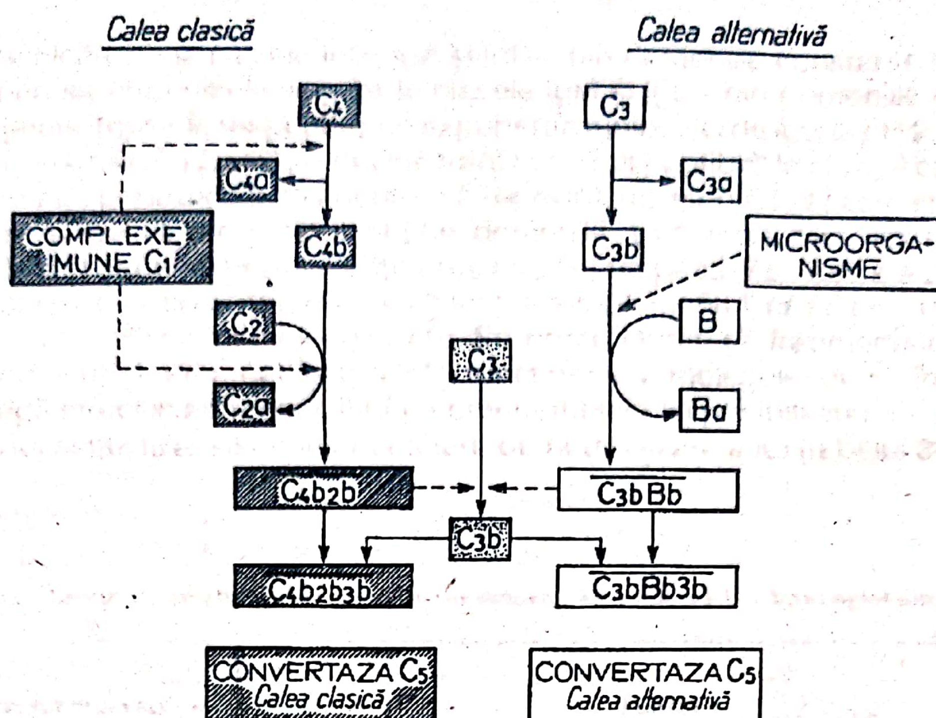



Fig.89. Analogia între "calea clasică" şi "calea alternativă" de activare a complementului. Ambele generează convertaza C3 ($\overline{C4b2b}$ pe cale clasică şi $\overline{C3bBb}$ pe cale alternativă). În calea clasică fragmentul C3b este obţinut prin scindarea componentei C3, pe când calea alternativă foloseşte C3b preformat (după I. Roitt şi col.).

Se formează "convertaza fixă" sau "properdin-dependentă" a căii alternative. Evenimentele se amplifică progresiv, cu activarea complexului de atac care va liza membrana bacteriilor sau celulelor eukariote. Procesul reactiv se stinge ca urmare a intervenţiei a cel puţin trei factori majori, şi anume: a) eliminarea bacteriilor sau celulelor străine, urmată de scăderea din ser a moleculelor polimerizate sau endotoxinelor şi, deci, diminuarea conversiei *C* 3 în *C* 3b; b) degradarea fragmentului Bb şi c) intervenţia competitivă a factorului H care va forma complexul inactiv *C* 3bH, complex ce va înlocui fragmentul Bb din convertaza $\overline{C\ 3bBb}$

ALTE FUNCŢII BIOLOGICE ALE COMPLEMENTULUI

În afară de funcţia citotoxică, complementul mai produce mediatori ai inflamaţiei şi anafilaxiei, factori chemotactici, opsonizanţi etc. (tabelul 50). De exemplu, fragmentul *C* 3a (anafilatoxina, eliberat ca rezultat al acţiunii convertazei *C* 3 asupra componentului *C* 3), se leagă la receptorii de pe mastocite şi bazofile, legare urmată de eliberarea de histamină şi alţi mediatori ai anafilaxiei.

**Unele proprietăţi biologice ale componentelor complementului (după M. Haeney)**

| Componentul | Greutatea moleculei (kD) | Concentraţia în ser ($\mu$g/ml) | Numărul polipeptidelor | Funcţii |
|---|---|---|---|---|
| *C* 1q | 410 | 150 | 18 | Neutralizarea virusurilor |
| *C* 1r | 83 | 50 | 1 | Iniţierea lizei virale |
| *C* 1s | 833 | 50 | 1 | |
| *C* 2 | 115 | 25 | 1 | Creşterea permeabilităţii vasculare |
| *C* 3a<br>*C* 3b | 180 | 1200 | 2 | Anafilatoxină imună, chemotaxie, aderenţă imună, opsonizare, mobilizarea leucocitelor din măduvă |
| *C* 4 | 210 | 550 | 3 | Aderenţă imună, iniţierea lizei virale |
| *C* 5a<br>*C* 5b | 180 | 70 | 2 | Anafilatoxină, chemotaxie, iniţierea lizei, degranularea mastocitelor |
| *C* 6 | 130 | 60 | 1 | Liză celulară |
| *C* 7 | 120 | 50 | 1 | |
| *C* 8 | 155 | 55 | 3 | |
| *C* 9 | 75 | 60 | 1 | |

Punctul nodal al declanşării activităţii biologice a complementului este activarea *C*3 şi formarea *C*3b, deoarece multe celule au receptori pentru acest fragment la care aderă. O parte din fragmentul *C* 3b se ataşează la *C* 4b2b formând convertaza C5(C4b2b3b) iar restul fragmentului, neadiţionat, se fixează la membrana celulelor ţintă sau pe complexele antigen-anticorp, fiind recunoscut de receptorii pentru *C*3b de la nivelul membranei granulocitelor PMN, eozinofilelor, macrofagelor, monocitelor etc. Acestea vor fagocita mai eficient celulele străine sau complexele antigen-anticorp (opsonizare) deoarece în acest proces, pe lângă receptorii pentru fragmentul *Fc* de pe membrana celulelor respective, sunt antrenaţi şi receptorii pentru *C*3b. Componenta *C*3 amplifică şi citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă (ADCC), datorită punţilor pe care le formează între celula ţintă şi cea citotoxică. Fragmentul *C* 5a, cu greutatea moleculară de cca. 11 kD, eliberat în cursul activării complementului ca rezultat al acţiunii *C* 4b2b3b, este chemotactic pentru celulele fagocitare, activând deplasarea lor către locul unde este prezent agresorul. De altfel, funcţii similare au şi fragmentul *C*3a şi complexul *C*5b6b. Fragmentul *C*5a activează fagocitoza şi eliberarea de oxigen toxic de către neutrofile, cu amplificarea posibilităţilor de distrugere a materialului fagocitat, provoacă degranularea mastocitelor şi bazofilelor, eliberarea de leukotriene de către PMN, creşte permeabilitatea vaselor, contracţia muşchilor netezi etc. Faptul că depleţia în componentele *C* 5 - *C* 9 induce lipsa sintezei de anticorpi din clasa IgG, dar nu şi a celor din clasa IgM, a dus la concluzia că aceste componente contribuie la formarea celulelor de memorie faţă de antigenele timodependente inoculate pe cale intravenoasă,

prezența lor favorizând fixarea antigenului pe celulele dendritice din centrii germinativi și stimularea celulelor *B*. S-a dovedit că fragmentele *C*3b și chiar *C*3d pot controla evoluția limfocitelor *B* spre faza *S* (de sinteză a imunoglobulinelor) precum și proliferarea limfocitelor *T* h care au fixat IL-2 la receptorii de membrană.

Pacienții cu leucemie limfatică cronică (LLC) au alterate funcțiile complementului datorită unor inhibitori ai componentelor *C*1r și *C*1s din care cauză au dereglată activitatea bactericidă serică.

Sinteza proteinelor complementului este reglată de către citokine, anticorpi, histamine etc. De pildă, IFN$\alpha$ stimulează secreția componentei *C*2, IL-1 și IL-6 sinteza *C* 3 etc. Receptorul pentru histamină de tip I ($H_1R$) stimulează, iar cel de tip II ($H_2R$) inhibă formarea componentelor complementului etc., toate acestea dovedind existența unor complexe mecanisme de reglare și autocontrol la nivel celular și molecular între diferitele compartimente ale sistemului imun.

## LIMFOKINELE ŞI MONOKINELE

Interleukinele (IL), interferonii (IF), factorul de necroză a tumorilor (TNF) și diverși factori de creștere alcătuiesc marea familie a *citokinelor,* mediatori solubili antigen-nespecifici secretați de diferite populații celulare cu rol biologic complex atât în cadrul sistemului imun, cât și în cadrul altor organe și sisteme. Sinteza lor este sub controlul unor gene situate la nivelul unor cromozomi diferiți (tabelul 51).

În linii generale, citokinele secretate de către limfocite se numesc *limfokine*, iar cele secretate de către monocite-macrofage, *monokine.* Desigur, aceste denumiri diferite sunt relative, deoarece unele molecule pot fi secretate atât de către limfocite cât și de monocite. Citokinele acționează prin intermediul receptorilor celulari activând sau inhibând funcțiile celulei respective. În mod normal, concentrația lor în ser este extrem de mică, de pe o parte datorită sintezei menținute la un nivel scăzut atunci când celulele sunt nestimulate, iar pe de altă parte, datorită rapidei inactivări și eliminări din circulație. Progresele mari realizate în clonarea ADN, în purificarea și caracterizarea lor, au făcut posibile atât obținerea de citokine în cantități mari, de ordinul miligramelor, cât și dobândirea de informații exacte privind structura chimică și unele funcții biologice, în special cele privitoare la rolul lor reglator în creșterea și maturarea celulară.

*Tabelul 51*

**Localizarea genelor unor citokine umane la nivel cromozomial**

| Produsul codificat de gene | Termen prescurtat | Gena localizată pe cromozomul |
|---|---|---|
| Interleukina 1$\alpha$<br>Receptorul pentru interleukina 1$\alpha$ | IL-1$\alpha$<br>IL-1$\alpha$ R | 2 |
| Interleukina - 2<br>Interleukina - 8 | IL - 2<br>IL - 8 | 4 |

| Produsul codificat de gene | Termen prescurtat | Gena localizată pe cromozomul |
|---|---|---|
| Factorul de stimulare a coloniilor de macrofage | M - CSF | |
| Factorul de stimulare a coloniilor de granulocite şi macrofage | GM - CSF | 5 |
| Interleukina - 3 | IL - 3 | |
| Interleukina - 4 | IL - 4 | |
| Interleukina - 5 | IL - 5 | |
| Interleukina - 9 | IL - 9 | |
| Factorul de necroză a tumorilor $\alpha$ | TNF - $\alpha$ | 6 |
| Factorul de necroză a tumorilor $\beta$ | TNF $\beta$ | |
| Interleukina - 6 | IL - 6 | 7 |
| Interleukina - 7 | IL - 7 | 8 |
| Interferonul $\alpha$ | IFN $\alpha$ | |
| Interferonul $\beta$ | IFN $\beta$ | 9 |
| Factorul de stimulare a coloniilor de granulocite | G - CSF | 17 |
| Interleukina - 11 | IL - 11 | 19 |
| Factorul de creştere a timocitelor | TGF | |

Caracterele lor generale sunt următoarele: a) greutate moleculară mică (<80 kD); b) moleculele sunt de regulă glicozilate; c) acţionează în manieră "autocrină" sau "paracrină"; d) interacţionează cu receptori de mare afinitate, reglând transcrierea unor gene prin semnale secundare. Multe sunt implicate în reglarea proliferării şi diferenţierii limfocitelor *B* (fig. 90). Se cunosc peste 20 de proteine încadrate în această familie, dar multe activităţi ale acestora se suprapun.

## INTERLEUKINELE

Termenul a fost adoptat pentru prima dată la cel de al II-lea Colocviu Internaţional asupra limfokinelor din anul 1979, din Elveţia. Sunt polipeptide produse de leucocite şi alte celule, cu rol de "hormoni ai sistemului imun", extrem de potente şi acţionând asupra unor ţinte multiple. Sunt implicate în reacţiile imune specifice şi în procesele inflamatorii, fiind cunoscute până în prezent 13 specii moleculare diferite, dintre care mai bine studiate sunt doar 8 (tabelul 52).

**Interleukina 1** este o glicoproteină transmembranară a cărei existenţă a fost semnalată în anul 1972, când s-a constatat că supernatantul celulelor mononucleare de om, şoarece, iepure etc. activate cu endotoxinele germenilor Gram-negativi potenţează răspunsul limfocitelor *T* stimulate *in vitro* cu lectine. De aici concluzia că macrofagele, pe lângă funcţia lor fagocitară, sunt şi celule secretoare cu rol în stimularea altor populaţii celulare. Prima denumire a acestor molecule a fost LAF (lymphocyte activating factor=factorul de activare a limfocitelor)iar ulterior, tot pe baze funcţionale, a primit o mulţime de alte denumiri (tabelul 53). Molecula, cu greutate de 17,5 kD, este rezistentă la temperatura de 56°C şi la *p*H 2-9, dar sensibilă la acţiunea pronazei, chemotripsinei şi tripsinei.

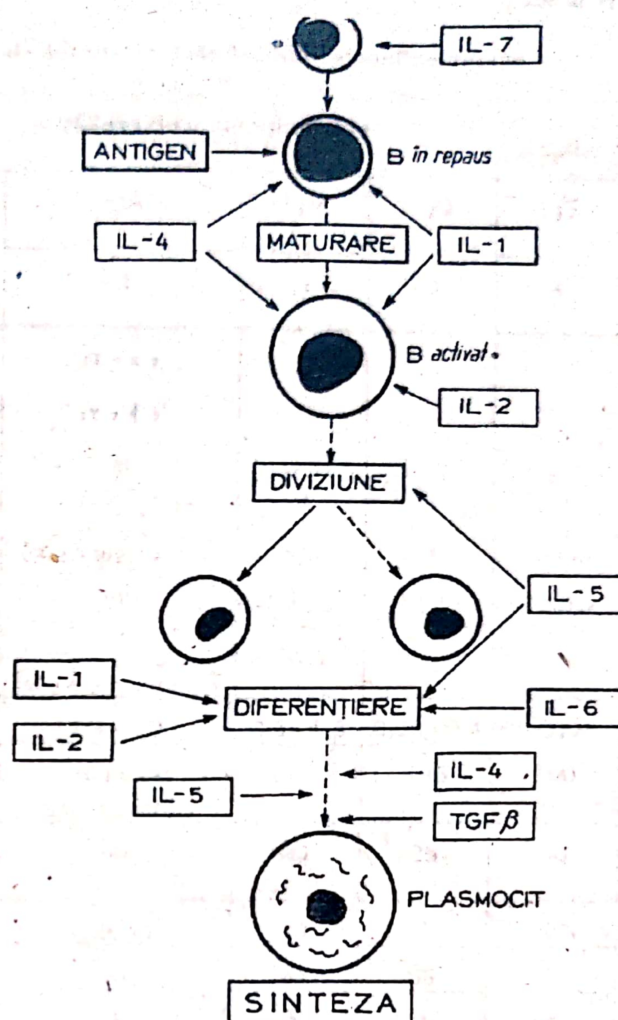



Fig.90. Intervenţiile unor interleukine în maturarea şi diferenţierea limfocitelor B.

*Tabelul 52*

**Unele caracteristici biochimice şi funcţionale ale interleukinelor umane mai bine cunoscute**

| Interleukina | Denumiri anterioare | Greutate moleculară | Sursa | Efecte biologice |
|---|---|---|---|---|
| IL - 1 | LAF | IL - 1α | - Monocite macrofage | - Eliberarea de limfokine din celulele *T* activate |
| | | 15 - 17 kD | - Celule dendritice | - Diferenţierea, activarea şi proliferarea celulelor *B*, multiplicarea fibroblastelor, celulelor endoteliale |
| | | IL - 1β | - Celule *NK*, *B*, *T*, endoteliale, fibroblaste, eritrocite, etc. | - Stimulează producţia de proteine S, colagenaze, PGE2 |
| | | 15 - 17 kD | | - Provoacă somn, febră, activează chemotactismul PMN |
| | | | | - P... nte în inflamaţii |

| Interleukina | Denumiri anterioare | Greutate moleculară | Sursa | Efecte biologice |
|---|---|---|---|---|
| IL - 2 | TCGF | 15 kD | - Limfocite *T* activate | - Proliferarea celulelor *T*<br>- Proliferarea şi diferenţierea limfocitelor *B*<br>- Creşterea activităţii citotoxică a limfocitelor *T, NK, K,* monocitelor |
| IL - 3 | 20 $\alpha$ SDH | 14,3 kD | - Limfocite stimulate cu lectine, clone de *T* activate | - Stimulează creşterea celulelor foarte tinere, progenitoare ale seriilor eritroide, mieloide, megakariocitare etc.<br>- Activează sinteza IL - 4 şi IL - 6 |
| IL - 4 | BSF - 1<br>BCGF - I | 15 - 20 kD | - Limfocite *T* activate | - Stimulează proliferarea limfocitelor *T, B,* sinteza de IgE, eliberarea receptorului *Fcε* de la nivelul limfocitelor *B*<br>- Acţionează sinergic cu IL - 3 în cursul diferenţierii mastocitelor şi bazofilelor |
| IL - 5 | BCGF - II | 48 kD | Celule *T* | - Induce diferenţierea eozinofilelor<br>- Stimulează sinteza IgM şi IgA |
| IL - 6 | BCDF<br>BSF - 2<br>IF - b2 | 26 kD | - Monocite, limfocite *T*, - fibroblaste, celule tumorale | - Induce exprimarea antigenelor MHC pe fibroblaste<br>- Activează sinteza proteinei *S* de către hepatocite<br>- Stimulează proliferarea şi diferenţierea limfocitelor *B* |
| IL - 7 | | 14,9 kD | - Celulele stromale din timus şi măduvă | - Acţionează asupra precursorilor limfocitelor *B* |
| IL - 8 | | | - Monocite, celule endoteliale | - Stimulează degranularea bazofilelor şi mastocitelor<br>- Chemotactice pentru PMN |

BSF=B stimulating factor; BCGF=B cell growth factor; BCDF=B cell differentiating factor.

*Tabelul 53*

**Denumiri diferite ale interleukinei-1**

| Denumirea | Simbolul |
|---|---|
| Lymphocyte activating factor (factor de activare a limfocitelor) | LAF |
| B cell activating factor (factor de activare a limfocitelor *B*) | BAF |
| Epidermal tyhmocyte activating factor (factor de activare a timocitelor epiteliale) | ETAF |
| Leukocytic endogenous mediator (mediator endogen leucocitar) | LEM |
| Mononuclear cell factor (factorul celular mononuclear) | MCF |
| Hepatocyte stimulating factor (factorul de stimulare a hepatocitelor) | HSF |
| Synovial factor (factorul sinovial) | SF |

Molecula are în compoziţia sa cca. 30% hidraţi de carbon şi se găseşte sub două forme care, deşi derivă din gene diferite, se leagă la acelaşi receptor: IL-1$\alpha$ cu 159 de reziduuri de aminoacizi şi IL-1 $\beta$, o proteină globulară stabilă cu 153 de reziduuri. Majoritatea moleculelor IL-1 $\alpha$ rămân stocate în celulă, fără să mai ajungă în circulaţie, fiind active numai în cazul contactului celulă-celulă. Moleculele IL-1 $\beta$ sunt eliberate extracelular sub formă de precursori cu greutate moleculară mare (36 kD) şi clivate de proteaze în molecule de 17 kD.

Molecula primordială mare este lipsită de aminoacizi hidrofili numiţi "peptide semnal" care opresc clivarea proteinei native în molecule "mature" de 17-22 kD. Din cauza lipsei unei peptide semnal, IL-1 $\alpha$ rămâne la nivelul membranei.

Asupra moleculei native de IL-1$\beta$, cu greutatea moleculară de 31 kD, acţionează o protează specifică (enzima convertoare IL - 1 $\beta$) care o scindează în forme active, cu greutatea moleculară de 17,5 kD şi îi facilitează exocitoza. Timpul de înjumătăţire *in vivo* este de 2-3 minute. Este larg răspândită în natură, fiind prezentă la artropode, urocordate, moluşte, echinoderme (steaua de mare), amfibii, peşti, păsări, mamifere, fapt care dovedeşte vechimea şi perfecta ei conservare de-a lungul evoluţiei filogenetice. La om, sinteza ei scade o dată cu vârsta, sinteză realizată de numeroase tipuri de celule aflate sub acţiunea unor inductori dependenţi sau independenţi de antigen (tabelele 54 şi 55). Din prima categorie fac parte contactele intercelulare realizate de moleculele de adeziune după stimulul antigenic, citokinele eliberate de limfocitele *T* activate, IL-1 exogenă etc. În a doua categorie intervin unele iritaţii celulare provocate de virusuri, bacterii, silicaţi, uraţi sau alte citokine cum ar fi TGF-$\beta$, TNF-$\alpha$ GM-CSF etc.

*Tabelul 54*

**Celule care pot sintetiza IL-1**

| Originea celulelor | Celulele sau organul în care se găsesc ele | Tipuri celulare care secretă IL - 1 |
|---|---|---|
| Granulocitară, mieloidă limfoidă | - Monocite | |
| | - Macrofage | - alveolare, peritoneale, sinoviale, Langerhans |
| | - Celule dendritice | - |
| | - Limfocite | - *Th, B, LAK, NK* (LGL) |
| | - Granulocite | - neutrofile, eozinofile |
| Diversă | - Vase | - endoteliale |
| | - Creier | - astrocite, microglii |
| | - Piele | - keratinocite |
| | - Alte celule | - renale, meningiale, fibroblaste, condrocite, epiteliale, timice, celule osoase, hepatice, foliculare din tiroidă, Sertoli (din testicul) etc. |

*Tabelul 55*

**Inductori ai sintezei IL - 1**

| Originea inductorilor | Inductori |
|---|---|
| Microorganisme şi unele substanţe produse de către acestea | - LPS, MDP, exotoxina stafilococică, PPD, toxina holerică, exotoxina *Ps.aeruginosa*, mycoplasmele, spirochetele, *Candida albicans*, virusul herpetic, HIV |
| Limfokine şi alţi mediatori solubili | - Factorul de stimulare a coloniilor (CSF), interferonii, factorii de necroză a tumorilor, IL - 2, IL - 6, componentele complementului (C3a, C3b, C5a), vasopresina |
| Diferite produse biologice sau chimice | - Hormonii steroizi, hidrocortizonul, proteina C reactivă, bradikinina, tuftsina, complexele imune, polimixina B, colchicina<br>- Zimozan, forbol miristat acetat (PMA), vitamina A, vitamina D3, radicalii de oxigen toxic |

Sinteza este inhibată sau diminuată de către prostaglandine ($PGE_2$), interferoni (IFN$\gamma$), infecţii cu virusul imunodeficienţei dobândite (HIV), virusul coriomeningitei, virusul Epstein-Barr (EBV) corticoizi, IL-4, IL-6, IL-10, histamine, lactoferină, ciclosporina A etc.

*In vivo,* IL-1 acţionează asupra sistemului imun, circulaţiei sangvine, sistemului nervos central, stimulând sau depresând unele funcţii ale acestora (tabelul 56). În linii mari, această limfokină stimulează *in vivo* proliferarea celulară, favorizează producerea febrei, a somnului, are activitate antitumorală, este implicată în procesele inflamatorii, în controlul hematopoiezei unde acţionează ca un cofactor etc. La nivel celular, activează exprimarea moleculelor de adeziune, activează GTP care, prin proteinele G, activează diferite enzime inclusiv un factor nuclear (NF-kB) stimulator pentru limfocitele *B*. Secvenţa fenomenelor ar fi următoarea:


IL-1+GTP→cAMP→ PKA→ NF-kB

*Tabelul 56*

**Funcţii activatoare sau inhibitoare ale IL-1**

| Stimulează | Deprimă |
|---|---|
| - Somnul de "undă lentă" | - Pofta de mâncare |
| - Producerea de hormoni (ACTH) şi citokine (G-CSF, GM-CSF) | - Activitatea plasminogenului |
| - Sinteza anticorpilor | - Presiunea venoasă |
| - Sinteza unor citokine | - *p*H-ul sangvin |
| - Funcţiile fagocitare | - Sinteza albuminei |
| - Chimiotactismul | - Concentraţia $Zn^{2+}$ şi $Fe^{2+}$ |
| - Hematopoieza | - Sinteza lipoproteinelor |
| - Protecţia contra iradiaţiilor | - Sinteza acizilor graşi liberi |

| Stimulează | Deprimă |
|---|---|
| - Aderenţa leucocitelor la peretele vascular<br>- Sinteza proteinelor de "fază acută"<br>- Sinteza componentelor complementului<br>- Sinteza corticosteroizilor<br>- Sinteza proteinelor hepatice<br>- Eliminarea $Na^+$<br>- Proliferarea limfocitelor *T*, *B*, fibroblastelor, keratinocitelor, celulelor sinoviale, mezangiale, gliale<br>- Eliberarea proteoglicanilor din cartilaje | - Adsorbţia intestinală a lipidelor<br>- Proliferarea celulelor endoteliale |

Odată fixată la receptorul de pe membrana plasmatică a celulelor, IL-1 declanşează transmiterea intracelulară a diferitelor semnale ca : activarea proteinkinazelor, creşterea pragului intracelular al cAMP care activează NF-kB ce se fixează la ADN, activarea PLC legată la fosfatidil-etanol-amină,.a calmodulinei, precum şi exprimarea genelor c-fos,-c-myc, c-jun etc. Nivelul concentraţiei în umori sau al sintezei IL-1 este diferit în unele stări patologice. În unele boli, sinteza este crescută, în timp ce în altele, este foarte scăzută (tabelul 57).

În spondilita ankilozantă şi în lepră, sinteza IL-1 este nemodificată.

Datele obţinute *in vitro* nu coincid total cu cele *in vivo,* unde sunt interacţii inevitabile cu alte citokine, şi unde supresia sau amplificarea funcţiilor unor citokine de către alte citokine este o formă de reglare biologică foarte complexă.

*Tabelul 57*

**Nivelul sintezei IL-1 în unele stări patologice**

| Sinteză crescută în | Sinteză scăzută în |
|---|---|
| - Tuberculoză<br>- Ulcer duodenal<br>- Septicemii<br>- Glomerulonefrite<br>- Artrită reumatoidă<br>- Sarcoidoză pulmonară<br>- Fibroză pulmonară<br>- Pneumoconioze<br>- Ciroză hepatică<br>- Sclerodermie sistemică<br>- Diabet insulinodependent | - Cancer hepatic, uterin, ovarian<br>- Infecţii acute<br>- Malnutriţie<br>- Psoriazis<br>- Scleroză în plăci<br>- LES (lupus eritematos sistemic)<br>- Vârsta înaintată |

**Interleukina-2 (IL-2)** este un factor solubil produs de către limfocitele *T* stimulate cu antigene, aloantigene sau mitogene. Molecula are greutate de 15 kD cu 133 reziduuri de aminoacizi. Sinteza acestei glicoproteine cu rol de "hormon imunologic" este sub controlul unei gene localizate pe cromozomul 4 şi este asociată cu exprimarea concomitentă a receptorului pentru ea (IL-2R) pe suprafaţa membranei plasmatice a celulei care o sintetizează. Activitatea de sinteză are loc în primele 4 ore după stimulul antigenic, continuă ascendent până în ziua a 3-a, după care începe un declin cu încetarea sintezei la 5-8 zile de la stimul. Pentru a o reactiva, şi în felul acesta a activa exprimarea IL-2R, este necesar un nou stimul antigenic şi un co-stimul generat de regulă de către IL-1. Sinteza maximă a IL-2 ar avea loc între 2-5 zile, cu implicarea unor enzime şi metaboliţi ai inozitolfosfatului în interdependenţă cu nivelul citoplasmatic al $Ca^{2}+$. Este inhibată de către ciclofosfamidă, cortizon, ciclosporina A, fosfolipaza $A_2$, prostaglandina $E_2$ etc., şi activată de IL-1, IFN, GM-CSF şi alte citokine. În afară de limfocitul *Th* (*CD4*$^+$)care este principalul ei producător, IL-2 este sintetizată în cantităţi mici şi de limfocitele *T* supresoare / citotoxice (*CD*8$^+$) şi poate şi de cele *NK*.

Molecula are o structură de $\alpha$ helix cu lanţul primar încolăcit şi răsucit în structurile finale sub formă globulară cu aspect de Y. De fapt sunt 6 helixuri dintre care trei (A,B,C) ar fi implicate în legarea ei la receptori, legare care se face la lanţul $\alpha$ (p55), în care prezenţa reziduului Arg ar avea un anumit rol. A fost obţinută prin "inginerie genetică" (rIL-2) cu cADN transferat la *Escherichia coli,* dar molecula recombinată (rIL-2) se deosebeşte de cea naturală prin înlocuirea în poziţia 125 a radicalului Cys cu reziduul Ser.

Interleukina-2 este un factor care stimulează proliferarea şi diferenţierea limfocitelor *T*, a unor celule *B* normale sau leucemice şi a unor precursori *NK*. Timocitele imature transcriu gena IL-2 care împreună cu cea IL-4 joacă un rol esenţial în dezvoltarea ontogenică a acestora, servind ca factori autocrini de creştere a precursorilor *T*. Această limfokină este profund implicată în dezvoltarea celulelor pre-*T* şi diferenţierea populaţiilor *T* h (*CD4*$^+$) şi *T* s/c (*CD*8$^+$). La şoarece, acţionează în circulaţia periferică autocrin, stimulând diferenţierea celulelor *T* h1 (de tip "inflamator") şi *T* h2 (de tip "ajutător"). Există un oarecare paralelism între IL-2 şi IL-4 în privinţa acţiunilor lor asupra diferitelor stadii de maturare *T*.

La nivelul intracelular, activează sinteza ARN a receptorilor pentru transferină, a genei c-myc, iar în cazul monocitelor stimulează producerea de IFN$\gamma$, IL-1, TNF. Accidental se poate instala un deficit de sinteză a IL-2 sau de exprimare a receptorilor pentru IL-2. Deficitul, întâlnit în boala Hodgkin, în LES (lupusul eritematos sistemic), lepră, AIDS, poate fi corectat prin administrarea de IL-2 exogenă. Dacă însă deficitul este la nivelul exprimării receptorilor, atunci adiţia de IL-2 singură este inoperantă. Administrarea ei în asociere cu timozina (fracţiunea $\alpha$ ) şi timozina $\alpha$ 1sau alţi hormoni timici ar putea fi o sursă de corectare a acestui deficit.

A fost încercată utilizarea IL-2 în clinică, sperându-se că prin activarea specifică a limfocitelor *T* c *in vitro*, sau a celulelor *LAK*, se va putea obţine liza tumorii *in vivo*. Până în prezent însă, rezultatele sunt neconcludente, la unii pacienţi înregistrându-se chiar efecte toxice, manifestate clinic prin hipertensiune arterială, infarct miocardic, insuficienţă respiratorie, edeme, hemoragii gastro-intestinale, modificări psihice etc.

**Interleukina-3 (IL-3)** este un factor de creştere hematopoietic produs la 12-20 de ore după activarea limfocitelor *T* de către antigen, mitogene sau anticorpi anti-receptori. Iniţial a fost definită ca un factor care ar putea induce exprimarea

enzimei 20 $\alpha$-hidroxisteroid dehidrogenază (20 $\alpha$ SDH) de către limfocitele splenice ale şoarecilor atimici *(Nu /Nu)*. Intervine direct ca reglator asupra creşterii precursorilor multipli hematopoietici angajaţi timpuriu ca progenitori ai granulocitelor, bazofilelor, eozinofilelor, macrofagelor sau mastocitelor. Excepţie fac celulele din seria eritroidă şi megakariocitară, asupra cărora IL-3 nu poate exercita controlul în vederea maturării lor decât în prezenţa eritropoietinei, respectiv a trombopoietinei. Stimularea hematopoiezei de către IL-3 este amplificată prin intervenţia altor citokine cum ar fi IL-1, IL-6, GM-CSF etc. Poate regla atât proliferarea monocitelor şi macrofagelor, cât şi adeziunea acestora la endotelii sau funcţia lor de prezentare a antigenului limfocitelor *T*. De asemenea, se pare că poate potenţa răspunsul inflamator indus de către endotoxinele germenilor Gram-negativi.

Structura chimică a moleculei, a cărei sinteză este inhibată de către ciclosporina A, a putut fi precizată după clonarea ADN, gena care-i controlează sinteza fiind situată la om pe cromozomul 5. Curios, IL-3 murină este mai apropiată ca structură şi secvenţă a reziduurilor de aminoacizi de cea umană decât de cea de şobolan, care este o specie mult mai apropiată din punct de vedere filogenetic decât omul. Molecula este o glicoproteină cu greutatea de 23-28 kD la şoarece şi 14,6 kD la om, şi cu 30-40% hidraţi de carbon dintre care cca. 12% sunt reprezentaţi de glucozamină. Are două reziduuri Cys, existând probabil posibilitatea realizării unor legături disulfidice între poziţiile 43 şi 106. Reziduurile Pro şi Leu din secvenţa moleculei au un rol critic în modularea funcţiilor biologice ale acestei limfokine.

IL-3 se leagă la receptorul ei cu afinitate mică sau mare, inducând fosforilarea tirozinei. Este activă în concentraţii mici (cca. 0,2 ng / ml) exercitând diverse activităţi biologice, toate asociate proceselor de proliferare şi diferenţiere a progenitorilor imaturi, printre care, proliferarea coloniilor celulare, producerea de histamină, activarea unor enzime etc.

Receptorul pentru IL-3 are un domeniu extracelular cu 417 reziduuri legate printr-un domeniu transmembranar. În ciuda lungimii sale, domeniul citoplasmic nu are activitate kinazică. Receptorul de mare afinitate este un complex multiproteic la care probabil sunt ataşate şi alte lanţuri accesorii.

Dereglarea în controlul hematopoiezei în relaţie cu IL-3 este unul dintre principalele mecanisme potenţiale care duc la leucemii. Aceste dereglări ar consta din exprimarea anormală a genei care-i controlează sinteza, din exprimarea anormală a receptorilor pentru ea sau pentru alţi factori de creştere, sau din ambele cauze. În urma acestor evenimente, progenitorul scapă de sub control şi deviază spre proliferare anarhică.

**Interleukina-4 (IL-4)** a fost descrisă iniţial ca "factorul de creştere a celulelor B murine" (BCGF) şi apoi ca un factor pleiotropic cu efecte multiple asupra diferitelor celule. Este o glicoproteină moleculară de 20 kD, secretată de către limfocitele *T* h, mastocite, bazofile şi fibroblastele stromei măduvei osoase. Secreţia IL-4 este o formă de răspuns al celulelor care au fixat alergenul la anticorpii IgE fixaţi citofil, acţionând ca un factor autocrin pentru aceste celule. Nivelul său în lichidele biologice ale subiecţilor normali sau cu diferite boli este extrem de scăzut, fiind probabil sub 20 pg / ml.

A fost obţinută iniţial din supernatantul de cultură a liniei de celule din timomul EL-4 stimulat cu PMA (forbol miristat acetat), din mediul de cultură a unor limfocite *T* activate prin stimul lectinic sau antigenic şi, ulterior, prin izolarea ADN recombinat (cADN) care codifică sinteza ei sau a receptorilor ei. IFN-$\gamma$ inhibă sinteza IL-4. Se leagă cu mare afinitate la un receptor monomer de tip imunoglobulinic cu

greutatea moleculară de 130 kD şi cu un domeniu extracelular format din 207 reziduuri de aminoacizi, unul transmembranar de 24 reziduuri şi unul lung, citoplasmic, de 569 reziduuri. Domeniul extracelular este foarte asemănător cu cel al IL-2R al receptorului pentru IL-3, al lanţurilor $\alpha$ şi $\beta$ al IL-6R, al GM-CSF R, IL-7R şi al receptorului pentru eritropoietină. Este relativ modest exprimat pe celulele *T* şi *B* în repaus sau activate, pe timocite, o celulă având cam 100-1000 de receptori pe suprafaţa ei.

Mult timp s-a considerat că această limfokină acţionează în exclusivitate asupra limfocitelor *B*, influenţându-le exprimarea antigenelor MHC de clasa II, a IgGI şi IgE pe membrană, precum şi evoluţia rapidă spre faza *S*. Ulterior însă, s-a dovedit că are un spectru larg de acţiuni, exercitând activităţi reglatoare nu numai asupra unor funcţii imune, ci şi asupra hematopoiezei (fig. 91). Stimulează multiplicarea celulelor *T* normale, proliferarea *in vitro* a unor linii stabilizate *T*, acţionează sinergic cu factorul de stimulare a coloniilor (CSF) cu efect stimulator asupra promonocitelor, megakariocitelor, precursorilor granulocitari, eritrocitari etc. Merită subliniat faptul că mecanismele de activare a limfocitelor *B* umane de către IL-4 sunt diferite de cele de la şoarece. La om, activarea *B* necesită hidroliza $PIP_2$, în $IP_3$ şi o creştere a concentraţiei $Ca^{2+}$ citosolic urmată de creşterea nivelului cAMP şi exprimarea receptorilor IgM pe membrană. La şoarece, IL-4 nu induce astfel de modificări. Această limfokină are rol important în reglarea sintezei IgE, inhibă sinteza TNF şi a IL-1, IFN$\gamma$ este antagonistul ei. Acţionează asupra unor tipuri diferite de celule, în diferite stadii de diferenţiere, efectul ei depinzând atât de tipul de celulă asupra căreia acţionează, cât şi de prezenţa altor citokine în mediu. La rândul ei, modulează producerea de citokine de către celulele *T*,*B*, *NK*, macrofage şi fibroblaste. Datorită acestor proprietăţi imunomodulatoare, acţionează ca agent anti-tumoral şi inflamator, antrenând în acest scop, celulele *T* c, macrofagele şi eozinofilele.

**Interleukina-5 (IL-5).** La începutul anilor 1970 s-a observat că supernatantul culturilor de splenocite murine stimula proliferarea eozinofilelor. În anul 1985, un grup de cercetători japonezi izolează, din mediul de cultură al unui hibridom de limfocite *T*, un factor care activa sinteza şi secreţia IgM de către celulele *B* murine

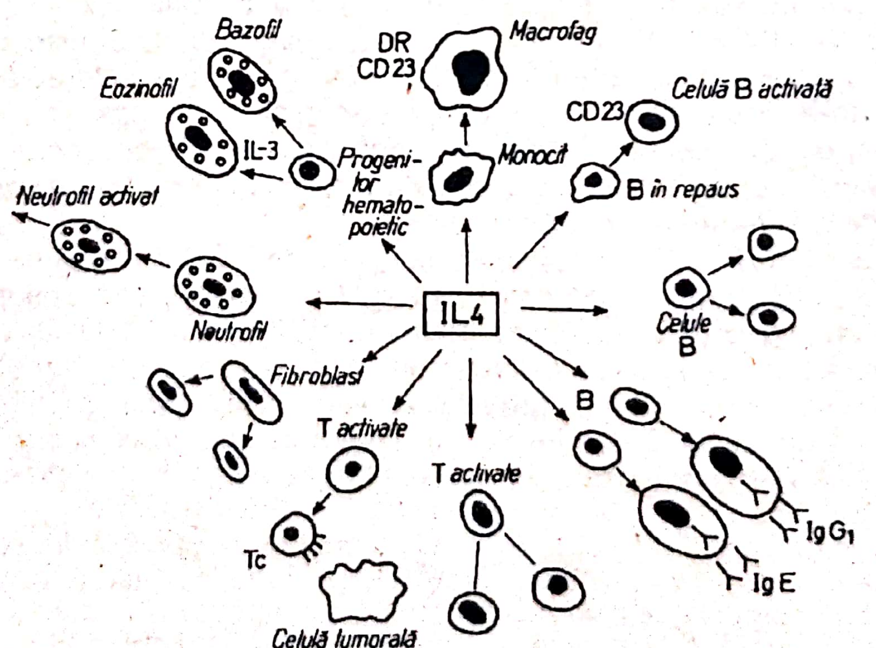



Fig.91. Diferiţi precursori celulari şi celule mature funcţional asupra cărora acţionează IL-4.

stimulate antigenic primar. Până atunci, factorii secretaţi de către limfocitele *T* cu efect activator asupra celor *B* sau asupra eozinofilelor aveau diferite denumiri (TRF, BCGF-II, EDF; T-replacing factor; B-cell growth factor-II; eosinophil differentiation factor). Prin clonarea moleculelor de ADN care codificau pentru TRF, s-a stabilit că, de fapt, responsabilă atât pentru activitatea TRF cât şi pentru cea a BCGF-II sau EDF este o singură moleculă, care a fost denumită IL-5. La şoarece, ea este produsă de către limfocitele *T*, fiind o glicoproteină cu greutatea moleculară situată între 32 şi 60 kD. Atât la om cât şi la şoarece acţionează ca un factor de diferenţiere a eozinofilelor. La şoarece, dar nu şi la om, ar acţiona şi ca factor de creştere a limfocitelor *B*.

Molecula matură are cel puţin două reziduuri Cys implicate în dimerizarea ei şi formarea de homodimeri prin legături disulfidice, condiţie esenţială pentru conferirea activităţilor biologice. Receptorul pentru IL-5, o proteină cu greutate moleculară de cca. 48 kD, este exprimat în exclusivitate pe limfocitele *B* activate şi pe eozinofile, exprimarea fiind puternic stimulată de către LPS. Acţionează sinergic cu IL-1 pentru inducerea sintezei de IgM şi cu IL-4 pentru sinteza IgG1. În afară de acţiunea asupra limfocitului *B*, IL-5 stimulează exprimarea receptorilor pentru IL-2 la nivelul membranei limfocitelor *T*, influenţând atât funcţiile citotoxice ale acestora cât şi cooperările celulare în răspunsul imun. De asemenea, este un factor de stimulare a eozinofilelor contribuind la proliferarea şi diferenţierea lor, la menţinerea viabilităţii şi la mobilizarea lor spre locul unde este prezent parazitul, amplificând răspunsul alergic. Nu acţionează asupra precursorilor hematopoietici ci asupra celulelor activate de IL-3 în asociere cu G-CSF, rolul lor în generarea eozinofilelor fiind din acest punct de vedere analog eritropoietinei.

În afară de acţiunea asupra progenitorilor eozinofilici şi formarea de colonii, IL-5 activează şi funcţia citotoxică anticorp-dependentă (ADCC) a acestor celule.

**Interleukina-6 (IL-6)** este o glicoproteină cu greutatea moleculară de cca. 21kD şi cu cca. 184 de reziduuri de aminoacizi, cu două situsuri de N-glicozilare şi două punţi disulfidice între reziduurile Cys 46-Cys 52 şi Cys 55-Cys 85.

Este produsă de către o mare varietate de celule ca: monocite, macrofage, limfocite *T* şi *B* activate, mastocite, fibroblaste, celule endoteliale, astrocite, celule gliale, keratinocite, celule epiteliale, celule neoplazice etc. şi acţionează asupra a diferite celule ţintă (fig. 92). În afară de G-CSF nu are omologie cu alte citokine, dar ocupă un loc central în reţeaua acestora, fiind influenţată de către unele substraturi activate de acestea şi influenţând la rândul ei activitatea altor mediatori (fig. 93). Acţionează pleiotropic asupra unui număr mare de celule şi ţesuturi, fiind implicată în inducerea diferenţierii celulelor *B*, sintezei proteinelor de fază acută de către celulele hepatice, promovarea creşterii celulelor mielom, proliferarea şi diferenţierea limfocitelor *T*, sinteza IL-2 şi exprimarea receptorilor pentru această interleukină etc. Inhibă proliferarea unor linii celulare mieloide, activează maturarea megakariocitelor, formarea de colonii multipotenţiale induse

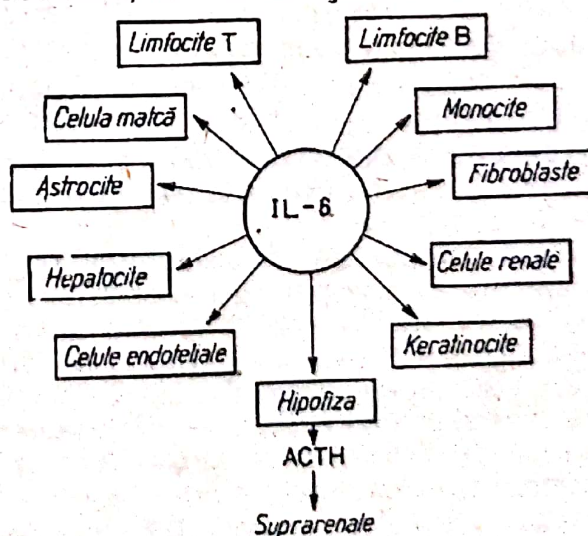



Fig.92. Celule sau organe ţintă asupra cărora acţionează IL - 6.

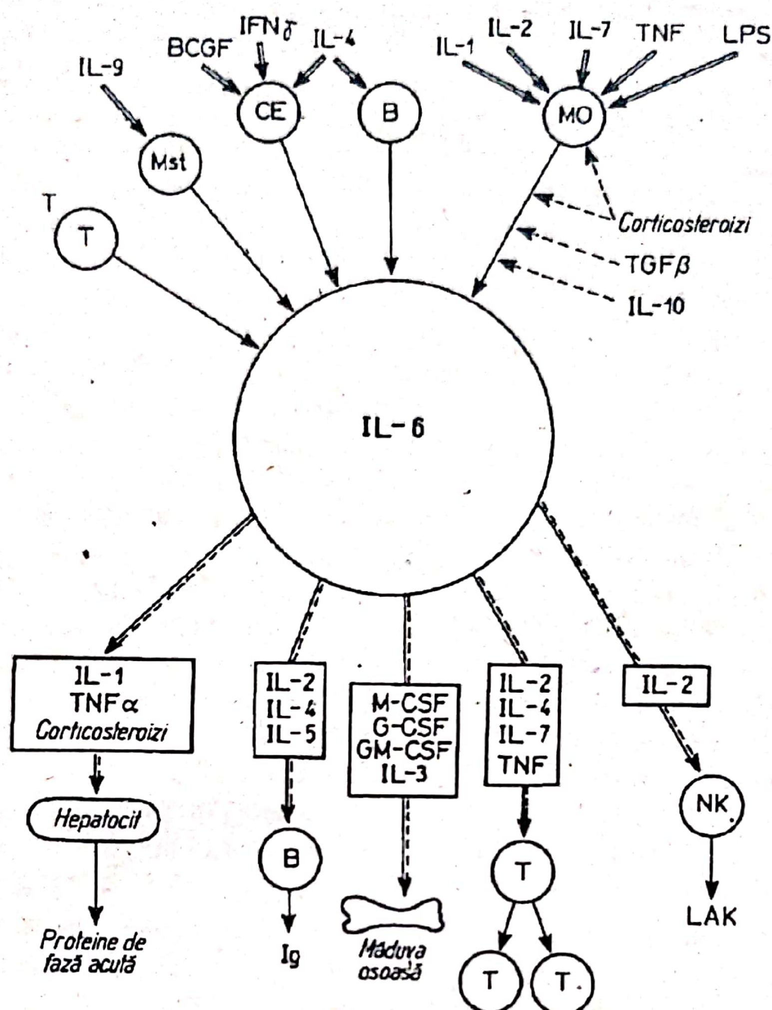



Fig.93. Poziţia IL-6 în "orchestra" citokinelor. Această citokină este în relaţii funcţionale cu alte citokine care, la rândul lor, vor influenţa unele celule sau organe ale sistemului imun.
Mst = mastocit; T, B = limfocite *T* sau *B*; MO = măduvă osoasă
⟹ activare în vederea sintezei; ⟶ sinteză; ⇢ coactivare; - - ⟶ inhibiţie.

de către IL-3, creşterea celulelor mezangiale, a keratinocitelor etc. Pe suprafaţa limfocitelor *T* în repaus, a celor *B* lipsite de IgD pe membrană (sIgD⁻), pe celulele mielom etc., este exprimat receptorul pentru IL-6, un dimer cu greutatea de 80 kD din familia imunoglobulinelor care, printr-un lanţ polipeptidic adiacent la o glicoproteină cu greutatea de 130 kD (gp 130), ar transmite semnale intracelular.

Deci, IL-6 este o citokină cu efecte multiple şi care acţionează asupra unor ţinte diferite (tabelul 58).

Sunt cunoscute mecanismele reglatorii care controlează exprimarea funcţională a genei pentru IL-6 de la nivelul cromozomului 7; un rol critic ar reveni unui factor nuclear (NF-IL-6) care ar recunoaşte secvenţa unui activator viral pentru virusul HIV sau $SV_{40}$ (virusul simian 40), infecţia virală inducând sinteza de IL-6. De aici ideea că infecţiile cronice virale duc la modificări funcţionale ale genei IL-6 prin activarea NF-IL-6. Aşa se face că această limfokină este implicată în patogeneza unor boli în care nivelul seric al ei este crescut. Este cazul unor anomalii policlonale B, al unor boli autoimune de genul artritelor reumatoide, cirozelor hepatice, al unor boli proliferative ca glomerulonefrita proliferativă mezangială, psoriazis sau al unor neoplazii cu referire specială la plasmacitoame şi mieloame, limfoame, leucemii, carcinoame etc.

*Tabelul 58*

**Unele activităţi biologice ale IL - 6**

| Ţinta asupra căreia activează | Acţiunea |
|---|---|
| Virusuri | - Blocarea multiplicării virionilor |
| Limfocitele *B* activate | - Stimularea diferenţierii celulelor<br>- Activarea sintezei de IgG şi IgM<br>- Sinergic cu IL-4 stimulează sinteza de IgE<br>- Sinergic cu IL - 5 stimulează sinteza de IgA<br>- Factor de creştere a limfocitelor *B* stimulate de virusul Epstein-Barr (EBV) |
| Limfocitele *T* | - Factor de activare a limfocitelor *T*<br>- Factor de diferenţiere a limfocitelor *T* c<br>- Sinergic cu IL-1, IL-4 şi IL-7 este co-stimulator al timocitelor şi limfocitelor *T* |
| Celulele *NK* | - Activarea funcţiilor citotoxice |
| Macrofage | - Stimulează activitatea bactericidă<br>- Modulează exprimarea markerilor de membrană<br>- Induce exprimarea receptorilor pentru IL-4<br>- Induce exprimarea moleculelor de adeziune ICAM-1<br>- Stimulează sinteza IL-1 şi TNF |
| Hematopoieză | - Cofactor, acţionând sinergic cu alte citokine în diferite stădii de diferenţiere |
| Hepatocite | - Factor de stimulare a hepatocitelor (HSF=hepatocyte stimulating factor)<br>- Stimulează producerea de fibrinogen, $\alpha$1-anti-chemotripsină, $\alpha$1-antitripsină, componentele *C* 1, *C* 3 şi *B* ale complementului<br>- Scade producerea de alfafetoproteină, transferină, albumină |
| Keratinocite | - Activează proliferarea |
| Granulocite PMN | - Le stimulează sinteza de lizozim, lactoferină, 3-glucuronidază |
| Diverse celule | - Inhibă apoptozisul |

De regulă, este o relaţie directă între gravitatea bolilor respective şi nivelul seric al IL-6: cu cât acest nivel este mai mare, cu atât boala este mai gravă, relaţia fiind, în linii mari, următoarea: activarea genei → sinteza anormală de IL-6 → activarea policlonală (în special a limfocitelor *B*) → patogeneza unor boli autoimune. Se găseşte în multe lichide biologice în cursul diferitelor procese infecţioase şi inflamatorii. Este un remarcabil marker de stres, sinteza ei fiind inhibată de IL-4, IL-10 şi TGF$\beta$.

**Interleukina-7 (IL-7)**, descoperită în anul 1988 în supernatantul culturilor de celule de măduvă osoasă, a fost denumită iniţial "limfopoietina 1", deoarece acţiona ca un factor de creştere a limfocitelor *B* şi oarecum şi a limfocitelor *T* aflate în stadii timpurii de dezvoltare. Culturile de celule din care a fost izolată constau din două populaţii diferite: un "pat" de celule de stromă a măduvei osoase, aderate la suprafeţele de material plastic, care permite proliferarea în suspensie a celulelor *B* imature. La şoarece, ARNm care transmite informaţia pentru această interleukină, se găseşte în concentraţii mari în timus dar nu şi în splină sau alte organe.

Celulele stromale eliberează IL-7, o glicoproteină cu greutatea moleculară de 14,9 kD şi cu 154 reziduuri de aminoacizi. A fost analizată secvenţa aminoacidă pentru molecula umană şi murină; ambele au conservate câte şase reziduuri de Cys cu duble legături disulfidice intramoleculă, fiind foarte apropiate structural. Au o secvenţă "leader" de 25 de reziduuri de aminoacizi, urmată de 129 aminoacizi cu două locuri potenţiale de glicozilare, unul la nivelul poziţiei 69 şi altul la poziţia 70. Interleukina-7 favorizează proliferarea precursorilor limfocitelor *B* care au exprimat intracitoplasmatic şi membranar lanţul greu ($\mu$), dar încă nu au exprimat lanţul uşor *L* al IgM. De îndată ce precursorul *B* a exprimat pe suprafaţa membranei molecula completă IgM, interleukina-7 devine inoperantă. De asemenea, intervine în proliferarea limfocitelor *T* imature ($CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^-$), încetându-şi influenţa atunci când devine imunocompetentă ($CD3^+$ $CD4^+$) sau $CD3^+$ $CD8^+$. Se pare că IL-7 acţionează totuşi pe limfocitele *T* aflate într-un stadiu mai avansat de maturare, ajutându-le să-şi exprime receptorul pentru IL-2, în timp ce pe limfocitele *B* acţionează în stadii incipiente de maturare. Activează sinteza de IL-1, IL-6, IL-8, TNF şi restabileşte nivelele normale ale limfocitelor *T* şi *B* la imunodepresaţi.

**Interleukina-8 (IL-8)**, sau "proteina activatoare a neutrofilelor", este secretată de către limfocitele *T* stimulate cu mitogene, de către monocitele activate cu citokine, precum şi de către fibroblaste sau celule endoteliale. Ar exista două forme moleculare diferite: un polipeptid alcătuit din 72 reziduuri de aminoacizi denumit "ser-IL-8" şi altul din 77 de reziduuri, denumit "ala-IL-8" (serică şi alanină IL-8) care ar avea la extremităţile $NH_2$ terminale serina, respectiv alanina. Limfocitele *T* şi monocitele eliberează predominant ser-IL-8 pe când celulele endoteliale şi fibroblastele sunt o populaţie moleculară care conţine 80% ala-IL-8. Această interleukină este un potent efector al funcţiilor antiinflamatorii, inhibând aderarea PMN la celulele endoteliale activate. *In vivo*, stimulează chemotactismul granulocitelor PMN, infiltrarea lor, degranularea bazofilelor şi mastocitelor, eliberarea moleculelor toxice de oxigen, protejează celulele endoteliale de potenţialul distructiv al PMN, proces mediat probabil de trombină, creşte permeabilitatea vaselor, produce febră etc.

**Interleukina-9 (IL-9)** este sintetizată de către limfocitele *T* şi monocite. Molecula are 144 de reziduuri de aminoacizi la care sunt ataşate diferite complexe de hidraţi de carbon, fapt care generează un anumit grad de eterogenitate a ei sub raportul greutăţii moleculare (30-40 kD). Exercită efecte biologice multiple asupra unor ţinte diferite (tabelul 59).

*Tabelul 59*

**Activitatea IL-9 asupra unor celule ţintă**

| Celula ţintă | Activitatea |
|---|---|
| Limfocite *T* | - Factor de creştere |
| Mastocite | - Stimulează proliferarea |
| Timocite fetale | - Activează mitogeneza |
| Megakariocite | - Activează proliferarea unor linii megakariocitare |
| Precursori eritrocitari | - Stimulează formarea coloniilor de astfel de precursori |

**Interleukina-10 (IL-10)** sau "factor de sinteză şi inhibiţie a citokinelor", cu greutatea moleculară de 30-40 kD, este sintetizată de către limfocitele murine $Th_2$ stimulate cu antigene sau ConA, precum şi de către limfocitele *B* normale sau unele limfoame *B*. Nu este sintetizată de către celulele $Th_1$, dar acţionează asupra acestora inhibându-le sinteza de IL-2, IL-3, TNF, IFN$\gamma$, GM-CSF.

În afară de $Th_1$, IL-10 stimulează timocitele în cooperare cu IL-2, IL-4 şi IL-7, induce exprimarea antigenelor MHC de clasa II pe membrana limfocitelor *B* şi stimulează, în asociere cu IL-3 şi IL-4, proliferarea mastocitelor. Inhibă producerea de către macrofage a IL-1, IL-6, IL-8 şi TNF. La om, este produsă de către limfocitele *Th* ($CD4^+$) stimulate policlonàl sau antigenic.

**Interleukina-11 (IL-11)**, produsă de către celulele stromale, are greutatea moleculară de 22 kD când este neglicozilată şi 199 de reziduuri de aminoacizi, în care predomină Pro (174) şi lipseşte Cys. Molecula umană este activă pentru celulele murine, dar cele murine nu au nici un efect asupra celulelor umane.

Acţionează asupra hepatocitelor stimulând sinteza de către acestea a proteinelor de fază acută. De asemenea, activează sinteza de către plasmocitoame a IL-6 şi producerea imunoglobulinelor de către plasmocite, acţionând sinergic cu IL-3. Stimulează formarea coloniilor megakariocitare şi a altor precursori hematopoietici. IL-11, în special atunci când acţionează sinergic cu IL-3, are o serie de activităţi comparabile cu cele ale IL-6 (tabelul 60).

**Interleukina-12 (IL-12)**, denumită şi "factor de creştere a celulelor matcă" (SCGF=stem cell growth factor), "factor de creştere a mastocitelor" (MCGF=mast cell growth factor) sau "factorul de stimulare a celulelor *NK*" (NKSF=NK stimulatory factor), este o moleculă dimer cu greutatea de 15-20 kD şi 248 reziduuri de aminoacizi, alcătuită din două lanţuri, p40 şi p35, codificate de gene diferite. Lanţul p 35 are omologie cu IL-6 şi G-CSF, iar cel p40 este similar receptorului pentru IL-6.

Se găseşte legată la membrana celulelor dar şi sub formă solubilă. Puternic glicozilată, este produsă de către diferite linii de celule stromale, de fibroblaste, carcinoame hepatocelulare şi acţionează ca factori de creştere asupra mastocitelor, precursorilor hematopoietici şi celulelor *NK*. Induce sinteza IFN$\gamma$ de către *NK*.

*Tabelul 60*

**Comparaţie între activitatea IL-6 şi cea a IL-11**

| Activitatea | Sinergism cu IL-3 | IL-6 | IL-11 |
|---|---|---|---|
| Induce proliferarea megakariocitelor | Da | + | + |
| Maturarea progenitorilor celulari | " | + | + |
| Stimularea eritropoiezei | " | + | + |
| Producerea de proteine de fază acută | Nu | + | + |
| Activarea sintezei anticorpilor | " | + | + |
| Stimularea plasmocitoamelor | " | + | + - |
| Activarea limfocitelor *T* | " | + | - |
| Producerea febrei | " | + | - |

IL-12 produs de către macrofage activează sinteza IFN$\gamma$ şi proliferarea limfocitelor *T* h1. La rândul său, IFN$\gamma$ activează sinteza IL-12, blocând-o pe cea a IL-4 şi IL-10, inhibitori ai IL-12.

Recent, a fost semnalată şi existenţa IL-13, IL-14, IL-15.

Deoarece existenţa acestor molecule cu rol de mediatori imunologici a fost pusă în evidenţă pe baza proprietăţilor lor funcţionale, era şi firesc ca denumirile iniţiale să fie făcute ţinând cont de aceste proprietăţi (tabelul 61).

*Tabelul 61*

**Unele denumiri anterioare ale interleukinelor**

| Interleukina | Denumirea anterioară | Simbolul |
|---|---|---|
| IL-1 | - Factorul de activare a limfocitelor | LAF |
| | - Pirogenul endogen | EP |
| | - Proteina mitogenă | MP |
| | - Factorul de înlocuire T-III | T-IIIRF |
| | - Factorul de activare a celulelor *B* | BCAF |
| | - Factorul de diferenţiere a celulelor *B* | BCDF |
| | - Factorul de activare a osteoclastelor | OAF |
| | - Mediator leucocitar endogen | ELM |
| IL-2 | - Factorul de înlocuire a celulelor *T* | TRF |
| | - Factorul de mitogeneză pentru limfocite | TCMF |
| | - Factorul de creştere a celulelor *T* | TCGF |
| IL-3 | - Factorul de promovare a creşterii | GPM |
| | - Factorul de activare a mastocitelor | MGF |
| | - Factorul de stimulare a celulelor producătoare de histamină | HIF |
| | - Factorul de stimulare a hematopoiezei | HSF |

| Interleukina | Denumirea anterioară | Simbolul |
|---|---|---|
| IL-4 | - Factorul de creştere a celulelor *B* stimulate antigenic | BCGF-I |
| | - Factorul de stimulare a celulelor *B* | BSF-1 |
| | - Factorul de creştere a celulelor *T* 2 | TCGF-II |
| | - Factorul 2 de creştere a mastocitelor | MCGF-2 |
| IL-5 | - Factorul de înlocuire a celulei *T* | TRF |
| | - Factorul 2 de creştere a celulelor *B* activate | BCGF-II |
| | - Factorul de diferenţiere a eozinofilelor | EDF |
| | - Factorul de stimulare a eozinofilelor | ESF |
| | - Factorul de creştere a sintezei IgA | - |
| IL-6 | - Factorul 2 de stimulare a celulelor *B* | BSF-2 |
| | - Interferon $\beta$2 | IFN$\beta$ 2 |
| | - Factorul de producere a imunoglobulinelor de către limfocitele B | BCDF |
| | - Factorul de stimulare a hepatocitelor | HSF |
| | - Interleukina 1 a hibridoamelor plasmocitare | HPGF |
| | - Inductorul 2 al coloniilor de monocite-granulocite | - |
| IL-7 | - Limfopoietina 1 | Lfp-1 |
| IL-8 | - Peptidul atractant/activator al neutrofilelor | - |
| | - Factorul chemotactic al neutrofilelor derivat din monocite | - |
| IL-9 | - Proteina activatoare a neutrofilelor | - |
| IL-10 | - Factorul de sinteză şi inhibiţie a citokinelor | - |
| IL-11 | ? | ? |
| IL-12 | - Factorul de creştere a celulelor matcă | SCGF |
| | - Factorul de creştere a monocitelor | MCGF |
| | - Factorul de stimulare a celulelor *NK* | NKSF |

În prezent, cea mai mare parte dintre interleukine, atât cele de origine umană cât şi murină au fost clonate, sunt cunoscute genele care le controlează sinteza şi localizarea acestora la nivelul cromozomilor, multe dintre ele fiind produse industrial în vederea utilizării în terapia unor boli.

## INTERFERONII

Interferonii sunt proteine sau glicoproteine cu activitate anti-virală, anti-tumorală şi imunomodulatoare, secretaţi de către diferite populaţii celulare infectate viral. Condiţionat de caracterul celulelor producătoare şi de structura lor moleculară, interferonii (IFN) aparţin la două tipuri distincte, şi anume: tipul I sau interferonii $\alpha$ şi $\beta$, secretaţi de către leucocite (IFN$\alpha$) sau fibroblaste (IFN$\beta$), de tipul II

sau "imun" (IFN$\gamma$) secretat de către limfocitele *T* şi celulele *NK* activate. Interferonii de tipul I sunt rezistenţi la *p*H acid, pe când cei de tip II sunt sensibili (tabelul 62). Deşi aparţin aceluiaşi tip, IFN$\alpha$ şi IFN$\beta$ se deosebesc antigenic atât între ei cât şi de IFN$\gamma$, care de altfel este activ în concentraţii mult mai mici decât cei de tipul I.

*Tabelul 62*

**Principalele caracteristici ale interferonilor**

| Caracteristica | IFN $\alpha$ | IFN $\beta$ | IFN $\gamma$ |
|---|---|---|---|
| Denumirea veche | - Tip I leucocitar | - Tip I fibroblastic | - Tip II imun |
| Sursa | - Limfocite *B*<br>- Macrofage | - Fibroblaste<br>- Celule epiteliale<br>- Macrofage | - Limfocite *T* |
| Inductori | - Virusuri<br>- Agenţi chimici | - Virusuri<br>- Agenţi chimici | - Antigene şi mitogene ale limfocitelor *T* |
| Mediul acid (*p*H=2) | - Rezistent | - Rezistent | - Sensibil |
| Temperatura de 56°C | - Rezistent | - Rezistent | - Sensibil |
| Greutate moleculară | 20 kD | 20 kD | 17 kD |
| Localizarea pe cromozomi a genelor care controlează sinteza IFN<br>- uman<br>- murin | <br><br>9<br>4 | <br><br>9<br>4 | <br><br>12<br>10 |
| Subspecii moleculare<br>- IFN uman<br>- IFN murin | <br>24<br>12 | <br>-<br>- | <br>-<br>- |

Eterogenitatea moleculelor şi a proprietăţilor lor biologice nu exclude posibilitatea identificării în viitor şi a altor interferoni. De altfel, a şi fost semnalată existenţa unor populaţii de astfel de molecule, denumită IFN$\delta$, produsă de către celulele mononucleare umane stimulate cu PHA (fitohemaglutinină) în prezenţa de teleocidină, şi IFNt sau trofoblastic, strâns înrudit cu IFN$\alpha$, produs de placenta şi embrionii rumegătoarelor. Faptul că, în afară de limfocite, IFN sunt produşi şi de către alte celule, face discutabilă încadrarea lor în rândul limfokinelor. Totuşi, această încadrare este justificată, deoarece ei au marcante funcţii şi efecte imunoreglatoare şi exercită, ca şi limfokinele, efecte asupra sistemului imun chiar şi atunci când se găsesc în cantităţi foarte mici.

În structura lor moleculară, IFN au un număr variabil de resturi de aminoacizi şi diferite încărcături moleculare cu hidraţi de carbon care se pare că nu sunt responsabili de activitatea biologică a moleculei. Într-adevăr, îndepărtarea hidraţilor de carbon nu are efecte semnificative asupra biologiei celulei.

Producţia IFN este indusă de către microorganisme şi în special virusuri, diferite extracte microbiene, polimeri sintetici de genul polisulfaţilor, politiosulfaţilor, polifosfaţilor, acidului poli-inozil-policitidilic (poli I:C) etc. La rândul lor, induc sinteza altor citokine şi exprimarea receptorilor pentru acestea.

**Interferonul** $\alpha$ **(IFN**$\alpha$**)** sau "leucocitar" este produs de către celulele albe sau liniile celulare limfoblastoide. La om şi şoarece există diferite subtipuri moleculare, care se deosebesc între ele prin numărul de aminoacizi care intră în compoziţia lanţului polipeptidic primar şi, implicit, prin greutatea lor moleculară. În medie sunt 166 de reziduuri de aminoacizi, gena care le controlează asamblarea fiind localizată pe cromozomul 19. Dintre inductorii săi principali, mai importanţi sunt viruşii, unele bacterii, acidul poli I:C şi unii polimeri sau substanţe cu greutate moleculară mică. Are efecte pozitive în terapia şi prevenirea infecţiei cu virusul B al hepatitei epidemice (HbS).

**Interferonul** $\beta$ **(IFN**$\beta$**)** sau fibroblastic este produs de către fibroblaste şi, ca atare, s-ar părea că încadrarea sa în grupa limfokinelor este incorectă. Totuşi, el ar fi produs şi de către leucocite, care ar exprima gene pentru această populaţie moleculară, iar receptorii care leagă INF $\alpha$ şi $\beta$ sunt identici. Mai mult, peste 30% din secvenţele aminoacide ale acestor două tipuri diferite sunt omoloage, iar inductorii sunt similari . Sinteza IFN $\beta$ este controlată de către o singură genă. În linii generale, legarea IFN $\alpha$ şi $\beta$ la receptori provoacă inhibiţia creşterii celulelor tumorale, a proliferării limfocitelor stimulate *in vitro* cu lectine, stimulează activitatea citotoxică a celulelor *NK,* creşte exprimarea antigenelor MHC, modifică structura suprafeţei celulei etc.

**Interferonul** $\gamma$ **(IFN**$\gamma$**)**, secretat de către limfocitele *T* ajutătoare şi citotoxice (*CD*4$^+$ şi *CD*8$^+$) şi de celulele *NK* activate, este o glicoproteină cu 146 de reziduuri de aminoacizi şi cu greutatea moleculară de cca. 17 kD, deosebită ca structură de interferonii de tip I. Sinteza IFN$\gamma$ este activată prin stimularea antigenică sau mitogenică a limfocitelor *T* şi de prezenţa IL-2, dar este inhibată de IL-4. Gena este localizată pe cromozomul 12. Pe suprafaţa limfocitelor, macrofagelor, fibroblastelor, pe celulele epiteliale etc. există receptori de tip II pentru IFN$\gamma$ cu specificitate de specie şi greutate moleculară 95-110 kD, diferiţi de receptorii pentru IFN de tip I. Interacţia IFN$\gamma$ cu receptorul induce transcrierea mai multor gene care conduc la sinteza de noi proteine dintre care unele, cum ar fi *proteinkinaza specifică* şi *2'5'-oligosintetaza,* inhibă multiplicarea virală. Oligosintetaza activează o endoribonuclează care degradează ARNm viral, iar proteinkinaza specifică fosforilează subunitatea $\alpha$ a factorului de iniţiere a sintezei, blocând astfel transducţia.

Interferonul $\gamma$ exercită o pletoră de efecte imunomodulatoare, fiind un inductor al exprimării antigenelor MHC de clasa II şi un element esenţial în activarea citotoxicităţii monocitelor şi macrofagelor, prin activarea sintezei de către acestea a oxidului azotic (NO) plecând de la Arg, NO fiind o moleculă efectoare potentă a citotoxicităţii antitumorale a macrofagelor. De asemenea, stimulează exprimarea receptorilor *Fc* pentru IgG cu afinitate mare pentru IgG monomer, activează citotoxicitatea *NK*, stimulează în asociere cu IL-2 funcţiile citotoxice ale limfocitelor *Tc* (*CD*8$^+$), sinteza IL-1 etc.

Activitatea cheie a IFN$\gamma$ este activarea macrofagelor cu rol esenţial în prezentarea antigenului de către limfocite, în eliberarea de monokine cu rol imunoreglator şi în sinteza radicalilor de oxigen toxic. Într-un cuvânt, IFN$\gamma$ este principalul activator al exprimării moleculelor MHC de clasa II pe monocite şi un component principal al activării reciproce a macrofagelor şi limfocitelor *T. In vivo,* pe lângă activitatea sa imunoreglatoare şi antivirală, este un factor crucial în conferirea rezistenţei organismului faţă de infecţia TBC, *Listeria monocytogenes, Leishmania donovani, Toxoplasma gondii* etc., deci, faţă de germeni cu localizare intracitoplasmatică. În acest scop, INF$\gamma$ pe de o parte activează funcţiile fagocitare ale celulelor, iar pe de altă parte induce o creştere a rezistenţei celulelor parazitare

față de acțiunea distructivă a parazitului acționând asupra triptofanului și, în consecință, asupra secvenței aminoacizilor din lanțul polipeptidic. Este un reglator al diferențierii limfocitelor *T*, un stimulator al funcțiilor citotoxice *Tc*, *NK* și *K*, un ihibitor al proliferării clonale a limfocitelor, dar un activator al exprimării moleculelor MHC de clasa II și al funcțiilor limfocitelor *B*, influențând direct și indirect mecanismele de apărare antivirală, bacteriană sau neoplazică. Acționează sinergic cu IL-2, IL-4 și GM-CSF în conferirea rezistenței față de *Leishmania major*, stimulează funcțiile macrofagelor în apărarea față de *Legionella pneumophilis*, iar în combinație cu IFN$\alpha$ și $\beta$ inhibă sinergic dezvoltarea *in vivo* a unor celule tumorale datorită efectului său antiproliferativ. Acționează sinergic cu prostaglandinele asupra celulelor *NK* , în sensul că prostaglandinele stimulează maturarea precursorilor *NK* iar IFN$\gamma$ funcția efectoare a celulelor NK *mature*.

Are însă și unele efecte "negative"; cum ar fi inhibiția sintezei prostaglandinelor indusă de IL-1, stimularea sintezei neurotoxinei, inhibiția proliferării keratinocitelor (care în psoriazis ar putea avea efect benefic), creșterea aderenței macrofagelor la glicoproteinele membranei bazale etc. Desigur, etichetarea de "efecte pozitive" sau "negative" este pur scolastică și nefiziologică deoarece, fiecare dintre acestea, la nivelul întregului organism, poate avea roluri bine definite în orchestrația populațiilor atât de numeroase ale mediatorilor solubili ai imunității.

În concluzie, interferonii de tip I sau II sunt citokine care stimulează producerea altor citokine, proliferarea limfocitelor *B*, sinteza imunoglobulinelor, și care inhibă multiplicarea celulelor normale sau transformate neoplazic. Totodată, sunt protectori potenți ai celulelor agresionate de către viruși sau de bacteriile cu localizare intracelulară.

## FACTORUL DE NECROZĂ A TUMORILOR (TNF=TUMOR NECROSIS FACTOR).

În anul 1971 a fost semnalată existența unui factor care provoacă regresia tumorilor transplantate *in vivo*, cu efect citotoxic *in vitro*. Puțin mai târziu (1975), se descoperă că substanța activă, capabilă să inducă distrugerea tumorii, este prezentă în serul șoarecilor tratați în anumite condiții cu BCG și LPS, fiind secretată de către macrofagele activate cu LPS în cooperare cu limfocitele *T*. S-a mai constatat că macrofagele, astfel stimulate, sunt responsabile de *cașexia* observată în unele infecții parazitare și boli neoplazice deoarece secretă un factor care inhibă lipaza lipoproteică prezentă în adipocite, factor denumit "cașectină" și care, purificat în anul 1985, s-a dovedit a avea o secvență similară cu cea a TNF.

Există două subpopulații moleculare diferite de TNF: TNF $\alpha$ sau "cașectina" și TNF$\beta$ sau "limfotoxina" , prima elaborată de către macrofage iar cea de a doua de către limfocitele aflate sub acțiunea LPS sau IFN$\gamma$. Ambele molecule au fost izolate în stare pură și analizate funcțional.

TNF$\alpha$ (cașectina) are trei subunități $\beta$-helix cu greutățile moleculare de 17 kD, cu 157 reziduuri de aminoacizi și o singură legătură disulfidică realizată de reziduurile Cys de la pozițiile 69 și 101. Este analoagă cu capsida picornavirusurilor. Limfotoxina sau TNF$\beta$ este o moleculă cu 171 reziduuri de aminoacizi și o structură similară TNF$\alpha$, deși omologia între ele, sub raportul secvenței aminoacizilor, este doar parțială: doar 30% omologie între moleculele $\alpha$ cu cele $\beta$ umane, în timp ce între TNF$\alpha$ uman și murin omologia este de 79%. Genele care controlează sinteza celor două tipuri de molecule sunt situate separat în

cadrul complexului MHC de pe cromozomul 6 uman. Gena TNF$\alpha$ are 4 exoni şi 5 situsuri de fixare pentru factorul nuclear NFkB, iar cea pentru TNF$\beta$ doar trei axoni.

În afară de celulele seriei mieloide inc iminate iniţial ca secretoare de TNF, în prezent se cunosc multe alte celule capabile de această funcţie (tabelul 63).

*Tabelul 63*

**Celule secretoare de TNF**

| | |
|---|---|
| - Monocite / macrofage | - Condrocite |
| - Limfocite *T, B, NK, LAK* | - Keratinocite |
| - Granulocite PMN | - Celule mezangiale |
| - Celule endoteliale şi epiteliale | - Celule Langerhans |
| - Mastocite | - Astrocite |
| - Fibroblaste | - Trofoblaşti |

După activare, toate aceste celule exprimă funcţional genele TNF. Activarea celulelor şi sinteza acestor molecule sau inhibiţia sintezei lor este sub controlul unor factori multipli (tabelul 64).

*Tabelul 64*

**Factori inductori şi inhibitori ai TNF**

| Factori inductori | Factori inhibitori |
|---|---|
| - Toxina pertusis | - Glucocorticoizii |
| - *Bordetela pertusis* | - Prostaglandinele |
| - Stafilococii | - Interleukinele (IL-4, IL-6, IL-10) |
| - Streptococii | - TGFb |
| - Lectinele (PHA, ConA, PWM) | - Alfaglobulinele |
| - Zimozanul | - Serotonina, histamina |
| - Unele citokine (IL-1, IL-2, IFN $\gamma$, GM-CSF) | - Catepsina |
| | - Elastazele leucocitare |
| | - Inhibitorii serin-protea elc |
| | - Clorochina |

Atât TNF$\alpha$ cât şi TNF$\beta$ sunt liganzi pentru acelaşi receptor, o structură membranară cu greutatea moleculară de 75 kD, existentă la nivelul diferitelor ţesuturi. Adipocitele, de exemplu, au cca. 10 000 de receptori pentru TNF pe suprafaţa lor. După legarea la receptori, citoxina este rapid internalizată şi degradată, devenind responsabilă de numeroase efecte biologice care culminează cu caşexie şi şoc. TNF$\alpha$ stimulează producerea colagenazei de către celulele epiteliale şi proliferarea fibroblastelor. În general, TNF exercită efecte pleiotrope asupra unui

mare număr de celule ca fibroblastele, osteoclastele, celulele endoteliale etc. (tabelul 65).

*Tabelul 65*

**Diferite celule ţintă asupra cărora acţionează TNF**

| Celula ţintă | Acţiunea |
|---|---|
| Celule tumorale | Liza celulară ca urmare a:<br>- activării endonucleazelor endogene<br>- fragmentării ADN<br>- formării de pori în membrana plasmatică<br>- activării sintezei moleculelor toxice de $O_2$ |
| Limfocite *T* | - Cofactor activator al timocitelor şi limfocitelor *T*<br>- Stimulează producerea de IL-2<br>- Stimulează exprimarea receptorilor pentru IL-2<br>- Stimulează exprimarea funcţiilor citotoxice a limfocitelor *Tc* |
| Limfocite *B* | - Cofactor stimulant al proliferării limfocitelor *B* activate<br>- Nu acţionează asupra celulelor *B* în repaus |
| Monocite / macrofage | - Stimulează producerea de $PGE_2$, IL-1, IL-8<br>- Împreună cu LPS activează funcţiile citotoxice şi citostatice<br>- Stimulează proliferarea astrocitelor<br>- Activează producerea de $H_2O_2$ şi $O^{\cdot}_2$.<br>- Activează exprimarea pe membrana celulară a *CD*11b, *CD*11c, *CD*45.<br>- Activează sinteza de $PLA_2$ |
| Granulocite PMN | - *In vivo*, provoacă neutropenie rapidă urmată de neutrofilie<br>- Activează metabolismul acidului arahidonic<br>- Creşte degranularea ca răspuns la $LTB_4$ şi PAF<br>- Scade exprimarea pe membrană a LAM-1, CD43 |
| Fibroblaste | - Induce sinteza de colagen şi fibronectină<br>- Induce sinteza de $PGE_2$<br>- Induce producerea de colagenază |
| Hepatocite | - Scade sinteza de albumină<br>- Creşte sinteza proteinelor de fază acută |
| Endoteliul vascular | - Stimulează exprimarea moleculelor de adeziune<br>- Stimulează exprimarea moleculelor MHC de clasa I<br>- Măreşte permeabilitatea vasculară<br>- Stimulează sinteza de IL-1, IL-6, IL-8 şi GM-CSF<br>- Creşte aderarea mononuclearelor şi polimorfonuclearelor<br>- Inhibă angiogeneza |

| Celula ţintă | Acţiunea |
|---|---|
| Sistemul nervos central şi periferic | - Acţionează asupra neuronilor din hipotalamus inducând febră prin intermediul IL-1 şi PGE2<br>- Favorizează regenerarea axonilor |
| Celulele sinoviale | - Induce producerea de $PGE_2$<br>- Induce producerea de colagenază<br>- Modulează sinteza metaloproteinazelor<br>- Modulează eliberarea de $O_2^-$ |
| Diverse alte efecte sistemice | - Caşexie, hipotensiune, modificarea ritmului cardiac, scăderea nivelului glicocorticoizilor şi al $Zn^{2+}$ plasmatic |

Activitatea antitumorală a TNF nu are specificitate de specie, unul dintre mecanismele majore prin care ar acţiona fiind acela de stimulare a eliberării, de către macrofage, a speciilor active de oxigen. Nu se cunosc încă suficient de bine mecanismele prin care TNF ucide celula tumorală, fiind posibilă existenţa următoarelor secvenţe: a) legarea TNF la receptori a căror exprimare este stimulată de către IFN$\gamma$: b) activarea metabolismului celular şi eliberarea acizilor graşi; c) generarea radicalilor de oxigen care ar leza ADN-ul celulei ţintă; d) fragmentarea ADN-ului celulei ţintă consecutiv activării sintezei de endonucleaze; e) activarea enzimelor lizozomale ale celulelor efectoare; f) mobilizarea glicogenului, scăderea *p*H-ului, moartea celulei (fig. 94). Şocul termic şi proteinele de stres reduc suscep-tibilitatea celulelor tumorale la acţiunea TNF. De asemenea prostaglandinele stimulează activitatea acestei citokine, aşa explicându-se de ce aspirina şi indometacinul, care sunt inhibitori ai prostaglandinelor, inhibă şi activitatea TNF.

Pe lângă efectul antitumoral, TNF are şi acţiune antivirală similară cu cea a IFN, modulează producţia de PAF, de prostaglandine, factori chemotactici, interleukine (IL-1, IL-6, IL-8), producerea de leucotriene de către granulocitele PMN etc. Are acţiune pirogenă, necrozantă, fiind un agent al şocului endotoxic care, acţionând sinergic cu IL-1 şi IFN$\gamma$ devine un important mediator al inflamaţiilor. Totodată, este un inductor al apoptozei pentru limfocitele *T* autoreactive.

Măsurarea activităţii antitumorale a TNF se poate face cu ajutorul unor linii celulare cum ar fi linia L129 sau WEHI-164.

În unele stări patologice, cum ar fi infarctul miocardic, bolile neoplazice, arsurile, infecţiile parazitare, creşte nivelul TNF$\alpha$ în umori, probabil ca urmare a stimulării celulelor producătoare. Tot TNF$\alpha$ este responsabilă de modificările cardiovasculare şi de necrozele hemoragice observate în şocul septic.

Deşi, ca şi în cazul IFN, au fost puse multe speranţe în utilizarea TNF ca agent antitumoral eficient, totuşi, inocularea acestei citokine *in vivo* a provocat decepţii, deoarece nu s-a dovedit a fi atât de nocivă pentru tumori cum se spera. Mai mult, s-a constatat că generează unele efecte adverse nedorite, cum ar fi avortul spontan, endocardita necrozantă, fibroza pulmonară, hipersensibilitatea de contact etc.

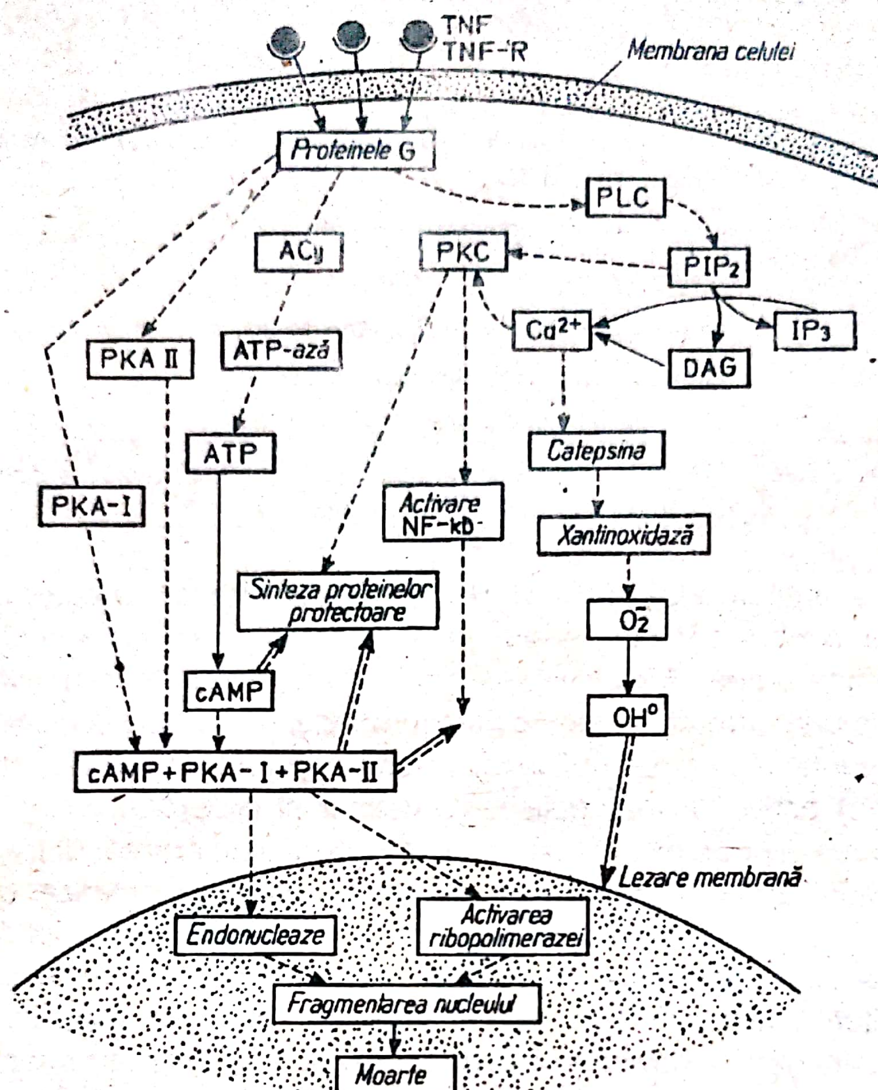



Fig.94. Mecanisme posibile prin care TNF poate leza celulele tumorale. După fixarea TNF la receptorul de membrană (TNF-R), se transmit semnale la proteinele G membranare. Acestea provoacă translocarea fosfolipazelor C (PLC) urmată de activarea inozitol-fosfaţilor cu formarea de inozitol-trifosfat (IP3) şi diacil-glicerol (DAG) care vor mobiliza $Ca^{2+}$ şi vor activa proteinkinaza C (PKC). Concomitent, este activată adenilatciclaza (ACy) care, prin adenozin-trifosfatază (ATP-ază) va scinda adenozin-trifosfatul (ATP) în adenozin-monofosfat ciclic (cAMP). Combinarea cAMP cu proteinkinazele AI şi AII (PKA-I, PKA-II) va bloca semnalele protectoare ale factorului nuclear (NF-k), amplificând formarea endonucleazelor şi ribonucleazelor care, în asociere cu efectul distructiv al hidroxil radicalilor (OH'), vor fragmenta nucleul ucigând celula.
—• transformare sau activare; - - • inhibare ⇒ semnale inhibitoare cu efect distructiv.

## CITOKINE CARE INTERVIN ÎN PROCESE STIMULATORII INFLAMATORII ŞI REPARATORII TISULARE

Unele dintre acestea, cum ar fi IL-1 şi TNF, au fost menţionate anterior. În afară de acestea, în prezent au fost identificate peste 90 de citokine care intervin în astfel de procese, dintre care cele mai complex studiate sunt factorii TGF, PDGF, FGF şi alţii, care modulează proliferarea celulelor epiteliale, endoteliale, fibroblastelor etc. Unii dintre aceştia acţionează direct asupra fibroblastelor, alţii indirect dar, în

orice caz, un rol central în sinteza sau activarea lor revine macrofagelor care, expuse la diverşi stimuli, transmit şi primesc semnale de la alte celule ale sistemului imun ce vor secreta la rândul lor diferite citokine inductoare ale fibrinogenezei (fig. 95).

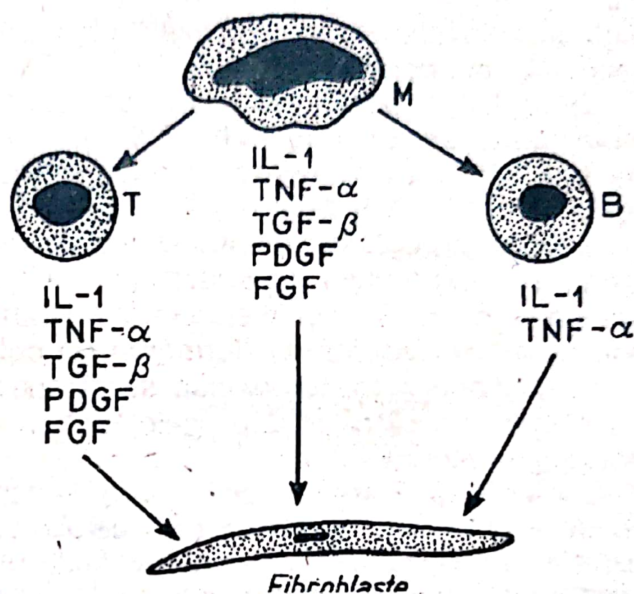



Fig.95. Citokine secretate de către macrofage (M), limfocite *T* sau *B* care stimulează fibrinogeneza.

În afară de macrofage, un rol important în fibrozarea ţesuturilor revine limfocitelor *T*. O dovadă privind rolul acestor limfocite este faptul că şoarecii atimici *Nu / Nu* sau cei trataţi cu ser anti-*CD*4 nu prezintă fibroze pulmonare, indiferent de stimulii care acţionează asupra macrofagelor pulmonare.

**Factorul de stimulare a coloniilor granulocitare şi macrofage (GM-CSF)** este o glicoproteină acidă cu greutatea moleculară de 22-23 kD şi cu 127 de reziduuri de aminoacizi, care induce proliferarea şi diferenţierea progenitorilor hematopoietici şi măreşte funcţia efectoare a granulocitelor şi macrofagelor adulte, inclusiv sinteza factorilor de stimulare a fibroblastelor. Iniţial a fost denumit "factorul de activare a macrofagelor", sau MAF. Genele care-i controlează sinteza au 4 exoni şi sunt situate pe cromozomul 5 la om şi pe cromozomul 11 la şoarece. Molecula are 4 situsuri de N-glicozilare.

Este sintetizată de limfocitele *T* stimulate antigenic sau cu diferite lectine şi acţionează stimulând proliferarea şi diferenţierea liniilor macrofagice şi granulocitare. De asemenea, induce diferenţierea megakariocitelor, eozinofilelor, iar în prezenţa eritropoietinei, contribuie la maturizarea eritrocitelor. Stimulează funcţiile monocitelor umane activându-le sinteza altor factori cum ar fi TNF, M-CSF, G-CSF. Totodată stimulează sinteza ARN, LDH (lactodehidrogenazei), activitatea tumoricidă, aderarea la celulele endoteliale, exprimarea antigenelor de histocompatibilitate de clasa I, exprimarea receptorilor pentru unele componente ale complementului etc.

**Factorul de stimulare a coloniilor granulocitare (G-CSF)** are greutate moleculară mică (0,6 kD) şi o omologie semnificativă cu IL-6 şi cu G-CSF de şoarece (peste 69,3%), din care cauză nu are specificitate de specie. În funcţie de numărul reziduurilor de aminoacizi din componenţa moleculei, G-CSF umană are două forme diferite: una, G-CSF$\alpha$ cu 177 reziduuri şi alta G-CSF$\beta$ cu 174 de reziduuri, sinteza ambelor fiind controlată de o genă cu 4 introni situată pe cromozomul 17. Este produsă de către monocitele şi macrofagele stimulate cu endotoxine şi INF$\gamma$, de celulele endoteliale şi de fibroblastele stimulate cu TNF sau IL-1, dar nu şi de limfocite.

Acţionează asupra hemocitoblastelor, precursorilor eritrocitari, asupra precursorilor granulocitari etc., stimulându-le diferenţierea. Activează legarea peptidelor chemotactice la membrana granulocitelor PMN.

**Factorul de stimulare a coloniilor de macrofage (M-CSF)** este o glicoproteină homodimeră formată din două subunităţi identice între ele, legate prin legături disulfidice care reglează proliferarea şi diferenţierea celulelor din seria mieloidă (monocite, macrofage).

Glicozilarea moleculelor este foarte diferită, din care cauză greutatea lor moleculară variază de la 45 la 90 kD, subunitatea neglicozilată având greutatea de 14,5 kD. Gena care-i controlează sinteza este situată pe cromozomul 7, în vecinătatea genelor pentru IL-3 şi GM-CSF. Este sintetizată de către celulele endoteliale, fibroblaste, monocite şi chiar de către unele linii celulare maligne *T*, rămânând exprimate pe suprafaţa celulelor sau, după clivarea enzimatică, ajungând în circulaţie şi în special în placentă ca molecule libere. Este eliminată prin urină. *In vivo,* induce formarea de colonii de precursori de macrofage şi stimulează activitatea tumoricidă, secretorie şi de eliberare a unor molecule toxice de oxigen de către macrofagele mature. De asemenea, stimulează sinteza acidului arahidonic.

Dacă GM-CSF are un spectru larg de acţiune, M-CSF şi G-CSF au o activitate relativ restrânsă la nivelul unor linii celulare unice (tabelul 66). Dar, şi într-un caz şi în altul, aceşti factori au putut fi purificaţi, genele lor au fost clonate şi secvenţele reziduurilor aminoacide din lanţul polipeptidic primar cunoscute.

*Tabelul 66*

**Unele caractere ale factorilor de stimulare**

| Factorul | Greutatea moleculară | Nr. aminoacizi | Gena pe cromozomul | Produs de către | Funcţii |
|---|---|---|---|---|---|
| GM-CSF | 22-23 kD | 17 | 5 (om)<br>11 (şoarece) | -Limfocite *T* stimulate | - Stimulează proliferarea şi diferenţierea macrofagelor, granulocitelor<br>- Induce diferenţierea megakariocitelor, eozinofilelor, eritrocitelor |
| G-CSF | 0,6 kD | 174 şi 177 | 17 | -Monocite/ macrofage stimulate cu endotoxine sau IFN$\gamma$<br>- Celule endoteliale<br>- Fibroblaste | - Diferenţierea granulocitelor PMN<br>- Acţionează asupra precursorilor eritrocitari şi asupra celulelor multipotenţiale |
| M-CSF | 45-90 kD | ? | 5 | - Monocite<br>- Fibroblaste<br>- Celule endoteliale | - Induce formarea de colonii de macrofage<br>- Stimulează activitatea tumoricidă, eliberarea de IL-1, TNF |

**Factorul de activare a trombocitelor (PAF).** Implicat în reglarea unor răspunsuri imune mediate celular, este un mediator al reacţiilor inflamatorii şi alergice. Iniţial (1970), a fost descris ca un mediator cu potente posibilităţi stimulatorii pentru trombocite, eliberat de către granulocitele bazofile. Factorul este un participant activ la numeroase interacţiuni celulare.

Din punct de vedere chimic, este 1-alchil- 2(R)-acetil-glicero- 3-fosforilcolină (fig. 96) în care cei doi radicali R sunt fie $C_{16}H_{35}$ fie $C_{18}H_{37}$ .

Sinteza PAF implică activarea enzimei de membrană $PLA_2$, inhibitorii acesteia blocându-i formarea. Cum activarea $PLA_2$ este dependentă de $Ca^{2+}$, stimularea mobilizării acestuia în interiorul celulei este urmată de sinteza şi eliberarea de PAF.

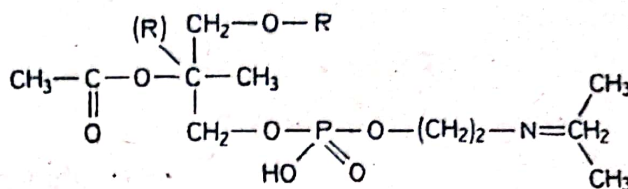



Fig.96. Structura factorului de aglutinare a trombocitelor (PAF).

Este produs de către granulocitele bazofile şi trombocitele stimulate cu ionoforul A23187, trombină sau colagen, de către granulocitele PMN, monocite, macrofage, eozinofile stimulate cu acelaşi ionofor, de moleculele de IgE, zimozan etc.

Unele linii celulare leucemice de tip *T* sau *B*, cum ar fi MOLT-4, eliberează PAF atunci când sunt stimulate cu PHA sau cu ionoforul A 2318 7.

Receptorii pentru PAF sunt exprimaţi pe trombocite, eozinofile, neutrofile, monocite, precum şi pe membrana celulelor epiteliului pulmonar.

Mediază agregarea trombocitelor, creşte permeabilitatea vaselor şi acumularea de trombocite la locul inflamaţiei, induce bronhoconstricţie, inflamaţia pulmonului, pielii, fiind un potent agent inflamator. Activează sinteza IL-1 şi modulează unele efecte ale IL-2.

**Factorul de transformare a creşterii (TGF).** A fost identificat iniţial ca produs al celulelor neoplazice sau al celor transformate fenotipic de către virusuri. Se găseşte în principal în trombocite, măduva osoasă şi rinichi.

Se cunosc două peptide distincte care au activitate biologică unică, dar care se fixează la receptori diferiţi: TGF$\alpha$ şi TGF$\beta$ cu speciile izoforme TGF$\beta$1, TGF $\beta$ 2 şi TGF $\beta$ 1.2 cu greutatea moleculară de 25 kD formate din două subunităţi a câte 12,5 kD.

Aceste molecule, secretate de către trombocite şi placentă, sunt implicate în procesele inflamatorii, vindecarea rănilor, dezvoltarea embrionilor şi a tumorilor, adică în unele procese de proliferare celulară. Succesiunea momentelor ar fi următoarea: agregarea trombocitelor ca răspuns la agresiune → eliberarea de PAF şi TGF → chemotactism PMN şi macrofagelor → activarea limfocitelor → proliferarea fibroblastelor. În fond, TGF acţionează indirect ca şi chemoatractant pentru macrofage, celule care au receptori pentru aceste molecule. După fixarea la receptori, le stimulează sinteza de mediatori care vor acţiona asupra fibroblastelor, celulelor endoteliale etc.

În momentul secreţiei TGF este inactiv, devenind activ numai după ce a suferit acţiunea unor enzime proteolitice secretate de către macrofage. În realitate, acest factor este un imunomodulator acţionând ca stimulator al proliferării fibroblastelor şi celulelor endoteliale, probabil prin stimularea sintezei factorului de creştere a endoteliilor (EGF) şi FGF (factorul de creştere a fibroblastelor), a fibronectinei şi procolagenului şi ca un inhibitor al limfocitelor *T* şi *B* şi al sintezei proteazelor

specifice. În acest fel, este blocată maturarea funcţională a moleculelor TGF proaspăt secretate.

**Factorul de creştere derivat din trombocite (PDGF)** este o proteină de 30 kD formată din două subunităţi a câte 17 kD legate între ele prin legături disulfidice. Există ca homodimeri şi heterodimeri şi sunt secretate de către macrofagele activate, fibroblaste, muşchii netezi şi celulele endoteliale.

**Factorul de creştere a fibroblastelor (FGF)** este de fapt o populaţie de peptide acide (aFGF) sau bazice (bFGF) cu efect stimulator asupra proliferării celulelor mezenchimale şi cu mare afinitate pentru heparină. Se găsesc în macrofagele peritoneale, în creier, adrenale, rinichi etc.

## ALTE CITOKINE

**Factorul de inhibiţie a migrării leucocitelor PMN (LIF)** este de fapt o esterază susceptibilă ireversibil la acţiunea unor inhibitori ai serinesterazei care activează sinteza enzimelor lizozomale ale PMN. Are greutatea moleculară de cca. 70 kD şi inhibă migrarea granulocitelor PMN, dar nu şi a macrofagelor peritoneale.

**Factorul de inhibiţie a migrării macrofagelor (MIF=migration inhibition factor)** este eliberat specific de către limfocitele *T* stimulate antigenic. Producerea MIF ar depinde de păstrarea capacităţii de sinteză a proteinelor de către limfocite şi nu de cea de proliferare a lor. Prezenţa sa este detectată la 4-6 ore de la activarea celulelor *in vitro* şi persistă cca. 48 de ore, după care începe declinul sintezei. Macrofagele ar avea receptori pentru MIF, bogaţi în $\alpha$-1- fucoză, care se regenerează după îndepărtarea lor prin mijloace enzimatice.

Se pare că suplimentarea mediului de cultură a limfocitelor cu glicolipide favorizează exprimarea numerică a acestora pe suprafaţa macrofagelor, fapt care ar sugera natura glicolipidică a lor. Este o mare variaţie în ce priveşte greutatea lor moleculară, variaţie înregistrată nu numai inter-specii de mamifere, ci chiar şi în cadrul aceleiaşi specii. De exemplu, la om sunt molecule cu greutatea de 12 kD dar şi cu greutăţi mai mari, care ajung până la 25 kD, iar la cobai, între 15 şi 670 kD, fapt care ridică problema dacă MIF este o moleculă sau o populaţie etero-genă de molecule.

**Factorul de "aglutinare" a macrofagelor (MAgF)** ar fi o limfokină secretată de către limfocitele *T* stimulate cu antigene sau mitogene care, ca şi MIF, are diferite greutăţi moleculare (50-370 kD), dar care se deosebeşte din punct de vedere antigenic de MIF şi de moleculele de imunoglobuline. Factorul este stabil la *p*H situat între limitele 3-9 şi la temperatura de 56° C, dar nu la 60°C. Este rezistent la hialuronidază dar sensibil la proteaze, fapt care sugerează posibilitatea ca MAgF să fie de fapt un acid hialuronic cu greutate moleculară mare. Specia de la care provine îi condiţionează unele proprietăţi. De exemplu MAgF, de iepure nu este sensibil la hialuronidază, pe când cel de cobai este sensibil la această enzimă. *In vitro* şi probabil *in vivo*, aglutinează macrofagele (fig. 97), proprietate pe care o au şi fibro-nectinele, o familie de glicoproteine cu greutate moleculară mare, alcătuite din subunităţi legate între ele prin legături disulfidice.

Ca şi MAgF, fibronectinele au greutăţi moleculare care variază de la o subunitate la alta şi de la o specie de mamifere la alta. Fibronectina de cobai are subunităţi cu greutate de 240 de kD, dar şi subunităţi cu greutate de 450 kD. Există o oarecare identitate între fibronectina plasmatică a cobaiului şi cea a omului, atât în ce priveşte antigenitatea lor, cât şi activitatea aglutinantă pentru macro-

fage. Probabil că MAgF este în realitate o fibronectină recunoscută de către diferitele molecule de adeziune de pe suprafaţa celulelor fagocitare.

**Factorul de creştere a epiteliilor (EGF)** este un lanţ polipeptidic cu cca. 53 reziduuri de aminoacizi şi 3 legături disulfidice. Molecula are 6 kD greutate şi multe proprietăţi comune cu TGF-$\alpha$. Acţionează ca factor de creştere şi keratinizare a epidermei, intervenind în vindecarea rănilor prin regenerarea epiteliilor. Controlează diferenţierea celulelor mucoasei intestinale şi inhibă secreţia gastrică acidă. Factorul este sintetizat de către limfocitele *T* şi recunoscut de celulele epiteliale care exprimă receptori pentru el, nişte glicoproteine transmembranare cu greutatea de 170-180 kD şi trei domenii: unul extracelular la nivelul căruia este situsul de legare a EGF, cu cca. 550 reziduuri de aminoacizi, unul scurt transmembranar (24-24 reziduuri) şi unul intracitoplasmatic cu situsuri de auto-fosforilare a tirozinkinazei.

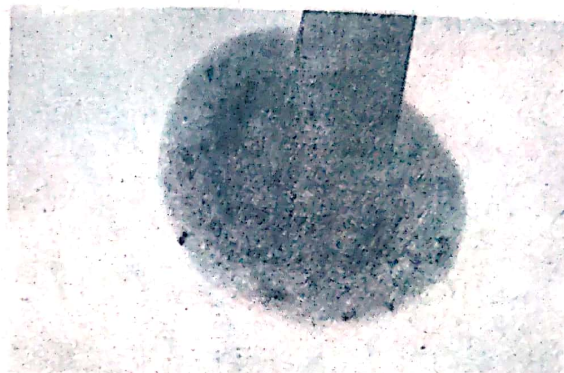


Fig.97. Aglutinarea macrofagelor migrate *in vitro* de către "factorul de aglutinare a macrofagelor" eliberat de limfocitele *T* (petele întunecate de pe suprafaţa ariei de migrare).

**Factorul de creştere a neuronilor (NGF)** este un trimer cu cca. 118 aminoacizi care stimulează utilizarea neurotransmiţătorilor catecolaminici (dopamina şi norepinefrina) de către nervi. Gena care-i controlează sinteza este localizată pe braţul scurt al cromozomului 1. Molecula este alcătuită din subunităţile $\alpha$, $\beta$ şi $\gamma$, legate între ele nu prin legături disulfidice ci prin $Zn^{2+}$. Activitatea biologică, exercitată asupra nervilor simpatici şi celulelor Schwann revine subunităţii $\beta$, subunităţile $\alpha$ şi $\gamma$ fiind serinproteaze (kalicreine). În creier, NGF induce creşterea cantitativă a acetilcolin-transferazei, stimulând în felul acesta sinteza acetilcolinei.

Receptorii pentru NGF sunt exprimaţi la nivelul celulelor nervoase ale encefalului şi nervilor periferici, precum şi pe suprafaţa celulelor melanomatoase.

**Tuftsina.** Este un tetrapeptid cu secvenţa Thr-Lys-Pro-Arg care face parte integrantă din molecula de IgG, găsindu-se la nivelul domeniului $C_H2$ al acesteia. Prin clivare enzimatică, este eliberată *in vivo* unde devine un potent stimulator al activităţii fagocitare şi bactericide a granulocitelor PMN care exprimă pe membrana lor plasmatică cca. 50 000-100 000 receptori specifici. Stimularea fagocitozei indusă de tuftsină poate fi abrogată prin splenectomie, acest organ jucând un rol vital în generarea sa din IgG. Ar exista o enzimă la nivelul splinei care ar cliva tuftsina din fragmentul *Fc* al moleculelor IgG fixate la receptorul *Fc* de pe membrana PMN. Odată eliberată, se ataşează la receptorii de pe membrana PMN, stimulându-le funcţiile fagocitare.

Legarea ei la receptori duce la creşterea nivelului intracelular al cGMP şi scăderea nivelului cAMP, la activarea eliberării $Ca^{2+}$ din celulă şi la stimularea producerii de specii toxice de oxigen ($O_2^-$, $OH^\bullet$, $H_2O_2$) care ar exercita efectul citotoxic antibacterian şi antitumoral. Receptorii sunt distribuiţi uniform şi difuz pe suprafaţa membranei plasmatice a granulocitelor dar, după legarea tuftsinei,

formează "pete", fiind rapid internalizaţi şi apoi redistribuiţi. Se pare că, în afară de granulocitele PMN, un număr mic de receptori ar fi şi pe membrana macrofagelor şi chiar a limfocitelor.

Această citokină stimulează activitatea tumoricidă şi bactericidă a granulocitelor şi macrofagelor, chemotactismul lor, le activează migrarea, măreşte potenţialul lor citotoxic etc. Ar mai stimula răspunsul limfocitelor la mitogene şi citotoxicitatea celulelor *NK* (fig. 98). Nu influenţează producerea de IFN şi eliberarea enzimelor lizozomale.

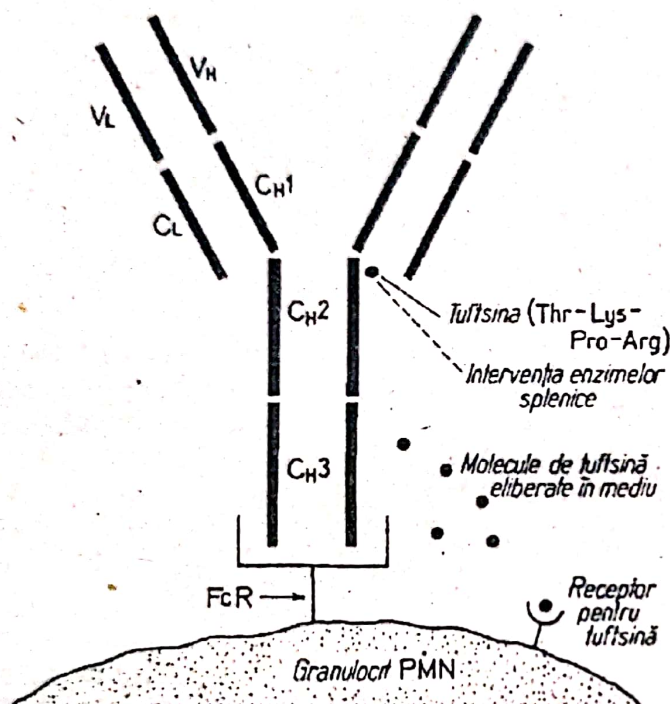



Fig.98. Detaşarea tuftsinei de la nivelul moleculei IgG. După fixarea citofilă a IgG la receptorul de pe membrana granulocitului PMN (FcR), intervin enzime eliberate de splină, care detaşează tetrapeptidul situat la nivelul domeniului CH2. Acesta se va fixa la receptorul pentru tuftsină de pe membrana plasmatică a aceleiaşi celule.

Există unele persoane care moştenesc congenital unele dezordini în sinteza tuftsinei sau care au în exces unii inhibitori ai acesteia. În astfel de situaţii, se înregistrează infecţii rebele cu stafilococi, mielofibroze, leucemii, susceptibilitate la boli neoplazice.

Bolnavii splenectomizaţi devin foarte rapid deficienţi în acest factor, potenţialul ei de sinteză fiind rapid refăcut după retransplantarea splinei care va asigura producerea enzimei necesară clivării tuftsinei de la nivelul domeniului CH2 al moleculelor de IgG.

## ALTE FAMILII DE MOLECULE

### FAMILIA PROTEINELOR CARE LEAGĂ $Ca^{2+}$

Sunt proteine termostabile care leagă $Ca^{2+}$ şi activează fosfodiesterazele nucleotizilor ciclici, influenţând profund procesele fiziologice ale celulei. Din această "familie" fac parte *troponina, calsechestrina, parvalbumina* şi *calmodulina*, ultima fiind cea mai importantă. Calmodulina conţine patru domenii de legare a $Ca^{2+}$. Participă la polimerizarea şi depolimerizarea microtubulilor,

la fosforilarea receptorilor pentru hormoni, la eliberarea de neurotransmiţători, la contracţia muşchilor netezi. De asemenea, participă la sinteza ADN şi mitoza celulară, nivelul său crescând direct proporţional cu rata de proliferare celulară. Antagoniştii calmodulinei, cum ar fi naftalensulfonamidele, vincristina, fenotiazinele, clorpro-mazina, tamoxifenul, propranololul, nifedipina, $\beta$-endorfina etc., inhibă asamblarea microtubulilor, activitatea fosfodiesterazelor, blocând progresia celulelor din faza de repaus $G_0$ în ciclul celular şi, deci, proliferarea lor. Ei inhibă proteinkinaza *C*, influxul de $Ca^{2+}$, şi competiţionează cu antagoniştii canalelor de $Ca^{2+}$.

Calmodulina ar servi şi ca receptor pentru ciclosporina A, un inhibitor al transcrierii IL-2 şi IFN$\gamma$, proces care ar explica oarecum efectele inhibitorii ale ciclosporinei A.

## FAMILIA PROTEINELOR CU FUNCŢII DE "HORMONI LOCALI"

**Prostaglandinele (PG)** sunt compuşi biologici produşi practic de către ţesuturile organismului care au suferit un proces de stimulare sau de iritare a membranei plasmatice. Sunt sintetizate în interiorul sau în apropierea locului "iritat" şi au fost considerate ca "hormoni locali" produşi în apropierea celulelor ţintă, fără a avea activitate sistemică. PG sunt printre cele mai active şi mai răspândite substanţe în natură, prezenţa lor fiind semnalată la vieţuitoarele inferioare cum ar fi coralii sau chiar la specii din lumea vegetală. Deoarece sunt produse local în cantităţi foarte mici şi au o durată de existenţă foarte scurtă datorită catabolizării lor rapide, concentraţia lor în ser este extrem de mică. În condiţii normale se găsesc cca. 10 pg / ml pentru ca, în arsurile grave sau în leziuni iritative care interesează suprafeţe mari ale pielii, concentraţia lor în ser să atingă valori până la 1 000 - 3 000 pg/ml.

Din punct de vedere chimic, PG sunt acizi graşi nesaturaţi, hidrolizabili şi polioxigenaţi, cu 20 de atomi de C, care conţin un inel de ciclopentan. Sunt produse în urma acţiunii enzimei ciclooxigenază asupra acidului arahidonic eliberat din fosfolipidele membranei plasmatice. Sinteza lor poate fi indusă de către o multitudine de stimuli care perturbă membrana plasmatică a celulei, cum ar fi IL-1, TNF-$\alpha$, LPS, componentele complementului etc. În general au efect inhibitor asupra mitozei *in vitro* a limfocitelor *T*, a producerii de IL-2, sintezei de IgM de către limfocitele *B* etc. Efectele lor inhibitorii sunt provocate de legarea moleculei la receptorii de membrană, proces care stimulează un mesager secund, şi anume cAMP.

Scheletul de bază al moleculei este format din "acidul prostanoic" cu o formulă chimică încă ipotetică (fig. 99). Cele mai neînsemnate modificări ale acestui

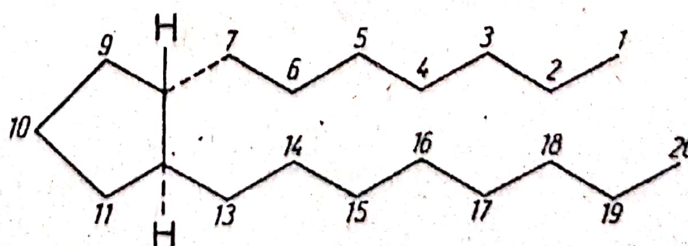



Fig.99. Formula ipotetică a acidului prostanoic.

schelet duc la conferirea unor efecte biologice total diferite moleculelor derivate din el. Toate moleculele, însă, au un atom de O la $C_9$, un OH la $C_5$ şi una sau două duble legături între doi atomi de carbon. Pe baza structurii şi activităţii lor biologice, se cunosc clasele A, C, D, E, F şi I, în cadrul claselor putând exista molecule cu una sau două duble legături. Deci, pot fi $PGE_1$, $PGE_2$ etc., de regulă cele mai abundente fiind moleculele de tip 2. Granulocitele PMN transformă o PG în alta prin mecanisme dependente de $H_2O_2$, de mieloperoxidaze lizozomale şi de ionii de Cl. Cele mai cunoscute şi răspândite sunt clasele E, bronhodilatatoare, cu rol important în reglarea răspunsului imun şi cele F, bronhoconstrictoare.

Sinteza PG şi formarea diferitelor clase de molecule au oarecum un caracter particular. După cum se ştie, membrana celulară este un dublu strat lipidic fluid, în care plutesc ca nişte "iceberg-uri" diferite proteine sau glicoproteine, adevăraţi "markeri" antigenici sau "receptori" de membrană. În mod normal, fosfolipidele de membrană sunt astfel dispuse încât sunt inaccesibile factorilor normali din mediul exterior al celulei. În cazul unui stimul care depăşeşte intensitatea sau condiţia normalului, fosfolipidele, prin reorientarea moleculelor în spaţiu, devin accesibile acestor factori. Din ele se formează acidul prostanoic care, sub acţiunea fosfolipazelor, se transformă în acid arahidonic, un acid gras, precursor al tuturor moleculelor de PG (fig. 100). Acest acid acţionează ca un mesager intracelular şi intercelular. El este de fapt format din esterificarea lipoproteinelor cu densitate mică din membrana plasmatică a celulelor sub acţiunea fosfolipazelor A, C şi D.

Acţiunea lipooxigenazelor asupra acidului arahidonic duce la formarea de leucotriene, participante majore în procesele inflamatorii, iar diversele sisteme generatoare de radicali de oxigen de genul $O^-_2$ induc formarea lipidelor chemotactice.

Sub acţiunea prostaglandinsintetazei şi a unor cofactori, are loc hidroliza enzimatică a acidului arahidonic care, consecutiv atacului unui complex enzimatic microzomial - "endoperoxidsintetaza" - se transformă în endoperoxizii intermediari $PGG_2$ şi $PGH_2$ .

Complexul superoxid-sintetază prezent în membrana tuturor celulelor organismului, cu excepţia hematiilor, are două activităţi enzimatice distincte: de

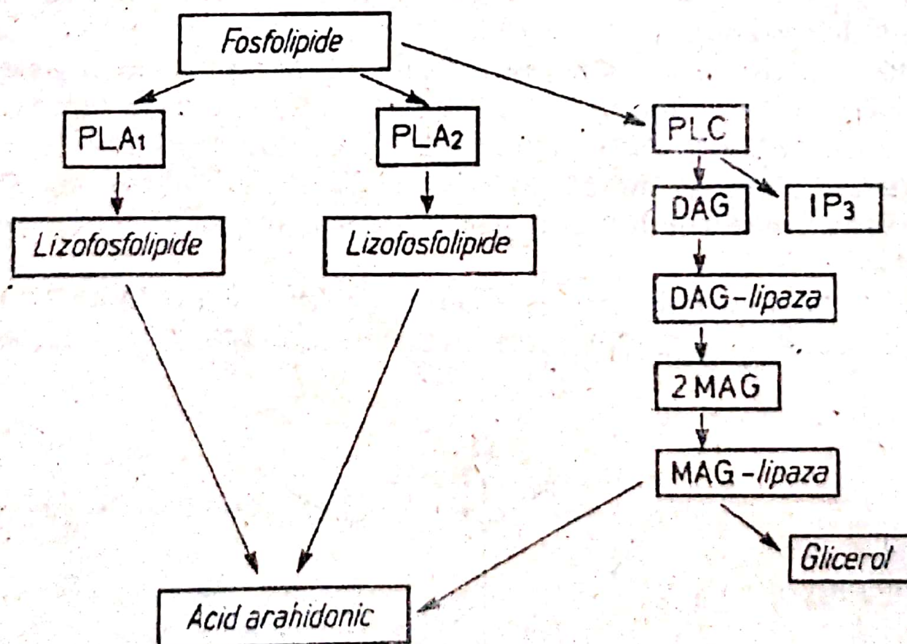



Fig.100. Modalităţi de sinteză a acidului arahidonic ca urmare a stimulării unor enzime cu impact asupra fosfolipidelor membranare. DAG = diacil-glicerol; $IP_3$ = inozitol-trifosfat; MAG = monoacilglicerol, $PLA_1$, $PLA_2$, PLC = fosfolipaze A1, A2, C.

"ciclooxigenază" şi de "peroxigenază". Sub efectul ciclooxigenazei se formează endoperoxidul, iar peroxidaza facilitează intervenţia enzimei prostaglandinsintetază cu formarea $PGG_2$ din care, prin legarea unui grup OH la $C_{15}$, se formează $PGH_2$. Endoperoxizii de viaţă scurtă, $PGG_2$ şi $PGH_2$, sunt rapid metabolizaţi prin reacţii catalizate, generând şase produse diferite: $PGE_2$, $PGF_{2\alpha}$, $PGD_2$, $PGI_2$ (denumită şi prostaciclină), acidul heptadecatrienoic (HHT) şi tromboxanul $A_2$ ($TxA_2$). Intervenţia unei izomeraze transformă prostaglandinele E în PGA şi PGB, iar dehidrogenazele metabolizează rapid $PGE_2$ şi $PGF_2$ $\alpha$, metabolizare care are loc în special la nivelul pulmonului.

Iniţial s-a crezut că PG, pe lângă efectul fiziologic predominant de contractare şi relaxare a muşchilor netezi, au rol doar în procesele inflamatorii. Ulterior, însă, a devenit clar faptul că ele au o multitudine de funcţii biologice (tabelul 67), intervenind în procesele fiziologice care au loc la nivelul muşchilor netezi, în transmisia influxului nervos, în interacţiunile hormonale şi implicit, în cele imune.

*Tabelul 67*

**Activitatea biologică a unor clase de prostaglandine**

| Prostaglan-dina | Activitatea biologică |
|---|---|
| A | - Influenţează metabolismul hidraţilor de carbon<br>- Stimulează sinteza cAMP<br>- Este implicată în transmiterea impulsurilor la nivelul sistemului nervos central |
| $E_1$ | - Stimulează formarea trombusurilor<br>- Inhibă agregarea trombocitelor<br>- Produce vasodilataţie<br>- Bronhodilatator<br>- Stimulează sinteza cAMP<br>- Inhibă excitaţia nervoasă<br>- Inhibă fosforilarea proteinelor<br>- Puternic efect chemotactic<br>- Creşte rata infiltrării granulocitelor PMN |
| $E_2$ | - Produce vasodilataţie şi dilatarea bronhiilor<br>- Inhibă excitaţia nervoasă (inhibă eliberarea de noradrenalină)<br>- Creşte rata infiltrării granulocitelor PMN<br>- Stimulează sinteza cAMP<br>- Inhibă exprimarea antigenelor DR pe membrana celulei<br>- Inhibă proliferarea precursorilor granulocitari şi macrofagici din celula matcă |
| $F_{2\alpha}$ | - Are activitate vasoconstrictoare şi bronhoconstrictoare<br>- Stimulează sinteza cGMP<br>- Provoacă regresia corpului galben (luteoliza) |

Dar, pe lângă contractarea şi relaxarea muşchilor netezi din organele sistemului respirator, digestiv, genito-urinar etc., ele au un rol în transmiterea impulsurilor implicate în medierea durerii, influenţează metabolismul hidraţilor de carbon, produc regresia funcţională şi morfologică a corpului galben de gestaţie (luteoliza), inhibă formarea trombuşilor, au efect hipotensiv, inhibă secreţia sucului gastric, măresc motilitatea stomacului etc. În linii generale, prostaglandinele E potenţează acţiunile mediatorilor proinflamatorii, cele F contracarând aceste efecte.

De dată mai recentă s-a constatat că, pe lângă aceste multiple funcţii fiziologice, PG şi în special cele din clasa E au un rol important în procesele imune, intervenind în principal ca mediatori cu funcţii supresoare. Ele interacţionează reversibil cu cei cca. 200 de receptori de pe suprafaţa limfocitelor la o constantă de legare $K=2x10^{-9}$ M, stimulând sinteza cAMP cu inhibarea fosforilării proteinelor. Prostaglandinele influenţează comportarea celulei, inducând schimbări în funcţiile membranei, căreia îi alterează compoziţia în lipide, proteine şi glicoproteine şi, în consecinţă, induc schimbări în fluiditatea şi permeabilitatea membranei, alterări în captarea $Ca^{2+}$ etc. Creşterea nivelului cAMP în citoplasmă duce la scăderea nivelului cGMP (guanidin-monofosfatul ciclic), ambele având acţiuni antagoniste (tabelul 68).

*Tabelul 68*

**Exemple de antagonism funcţional la nivelul celular al adenozin-monofosfatului ciclic (cAMP) şi guanidin-monofosfatului ciclic (cGMP)**

| Mediatorul | Influenţa asupra celulelor |
|---|---|
| cAMP | Inhibitor al:<br>- proliferării celulare<br>- producerii de limfokine<br>- citolizei mediate celular<br>- formării rozetelor<br>- sintezei de anticorpi |
| cGMP | Activator al:<br>- proliferării celulare<br>- producerii de limfokine<br>- citolizei mediate celular<br>- formării rozetelor<br>- sintezei de anticorpi |

O sursă majoră de PG o constituie macrofagele care, sub acţiunea unor diverşi stimuli (zimozan, *C.parvum*, endotoxine, colchicină, ConA, complexe imune antigen-anticorp etc.), sintetizează clasele $PGI_2$, $PGE_2$, $PGF_{2\alpha}$ şi $TxB_2$. În general, metabolismul acidului arahidonic joacă un rol important atât în expri-

marea funcţiilor fagocitare a macrofagelor, cât şi în stabilirea interacţiunilor macrofag-limfocit.

Este o relaţie inversă între secreţia de IL-1 şi PG, dar şi între secreţia limfokinelor şi aceşti derivaţi ai acidului arahidonic. Sinteza PG, de către macrofage este activată şi de către stimulul pe care-l exercită tumorile asupra celulelor fagocitare. Mai mult, chiar celulele tumorale pot secreta aceşti mediatori, fapt care ar putea explica în parte mecanismele care stau la baza scăpării tumorii de sub supravegherea imunologică.

Dar şi lectinele care stimulează limfocitele şi induc o activare a sintezei limfokinelor activează eliberarea de către macrofage a PG care vor inhiba producerea în continuare a limfokinelor, constituind un alt mecanism de control al răspunsului imun. Se poate deci afirma că PG sunt mediatori solubili cu rol important în reglarea răspunsului imun, ele contracarând toate procesele care pot duce la hiperplazii celulare sau la hiperfuncţia acestor celule.

**Hormoni secretaţi de către organele limfoide primare.** Rolul major al acestor mediatori solubili îl reprezintă maturarea funcţională a limfocitelor *T* şi *B*. Iniţial, existenţa lor a fost pusă în evidenţă cu ajutorul unor metode relativ simple, S-a observat că efectul timectomiei neonatale este anulat dacă şoarecii sunt grefaţi cu fragmente de timus care, fie că sunt implantate în cavitatea abdominală ca atare, fie că sunt închise în nişte camere confecţionate din membrane Millipore cu diametrul porilor de 0,45 $\mu$. Datorită dimensiunilor mici ale porilor din pereţii acestor membrane, penetrarea precursorilor limfocitari şi contactul lor cu timusul nu se putea realiza, în schimb, era posibilă difuzarea moleculelor secretate de către acest organ. Maturarea funcţională a precursorilor limfocitari fără un contact direct cu ţesutul timic a constituit o dovadă certă a funcţiilor sale secretorii şi a rolului său de organ esenţial în maturarea normală şi în menţinerea la nivel funcţional a diferitelor subsete de limfocite *T*. Aceste funcţii au fost mai bine cunoscute după izolarea din timus sau sânge şi caracterizarea chimică şi biologică a factorilor secretaţi. S-a dovedit că aceştia au proprietăţi similare hormonilor, în sensul că au efecte multiple asupra celulelor şi sunt biologic activi în concentraţii extrem de mici.

Au fost identificaţi şi caracterizaţi diverşi factori de origine timică ce induc diferenţierea celulelor *T* imature, cu exprimarea antigenelor şi receptorilor de membrană şi a diferitelor funcţii biologice ale lor. Dintre cele mai bine cunoscute sunt familia timozinelor, timopoietinelor, timostimulinei, diverşilor factori timici etc. (tabelul 69).

*Timozina.* După o scurtă încălzire la temperatura de 80°C a omogenatului de timus de viţel şi extracţie cu acetonă, se obţine un grup de polipeptide cu greutatea moleculară de 1-15 kD, care alcătuiesc timozina fracţiunea 5, un hormon timic format din trei clase principale: $\alpha$, $\beta$ şi $\gamma$. Prin purificări ulterioare prin cromatografie de schimbători de ioni şi prin gel-filtrare, sunt obţinute 7 peptide din clasa $\alpha$ şi 4 din clasa $\beta$, (cele mai bine caracterizate fiind $\alpha$1) cu 28 de resturi de aminoacizi şi greutatea de 3,1 kD şi $\beta$1 cu 74 de resturi şi 15 kD greutate moleculară.

**Mediatori solubili secretaţi de către timus**

| Denumirea mediatorului | Simbolul | Greutatea moleculară | Activitatea biologică |
|---|---|---|---|
| Timozina 5:<br>Clasa $\alpha$: $\alpha_1$, $\alpha_2$, $\alpha_4$, $\alpha_6$, $\alpha_7$<br>Clasa $\beta$: $\beta_1$, $\beta_4$ | - | 1 - 15 kD | - Induce limfocitopoieza<br>- Activează diferenţierea limfocitelor *T*<br>- Stimulează exprimarea funcţiilor limfocitelor *T* ajutătoare (*Th*) |
| Timopoietina I şi II | - | 5 - 7 kD | - Inhibă transmisia neuromusculară<br>- Induce exprimarea antigenelor specifice celulelor *T* |
| Factorul umoral timic | THS | 3,2 kD | - Restaurează *in vivo* şi *in vitro* componenta imunologică mediată celular |
| Factorul seric timic | TFS | 1 kD | - Induce exprimarea antigenelor specifice celulelor *T* |
| Timostimulina | TS | 12 kD | - Activează exprimarea receptorului E ($CD_2$)<br>- Stimulează răspunsul *in vitro* la stimulii cu lectine |

*Structura primară a timozinei* $\alpha$1 este următoarea:

Ser-Asp-Ala-Ala-Val[5]-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu[10]-Ile-Thr-Thr-Lys-Asp[15]-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys[20]-Glu-Val-Val-Glu-Glu[25]-Ala-Glu-Asp-OH.

Timozina induce diferenţierea şi maturarea timocitelor şi precursorilor imaturi ai limfocitelor *T*, exprimarea receptorilor E (*$CD_2$*), activarea funcţională a limfocitelor *T* ajutătoare (*$CD_4$*) etc. Cu vârsta, nivelul seric al ei scade direct proporţional cu involuţia timusului. Administrarea de timozină *in vivo* creşte rata de supravieţuire la şoarecii timectomizaţi. Accelerează rejecţia alogrefelor, induce exprimarea antigenelor de suprafaţă de pe limfocitele *T*, activarea celulelor *T* citotoxice, *T* supresoare, *NK* etc.

De asemenea, măreşte rezistenţa la infecţii cu *Listeria monocytogenes* răspunsul *T* şi *B* la stimuli mitogenici *in vitro* etc.

*Timopoietina.* Sunt cunoscute de fapt timopoietinele I, II şi III, nişte polipeptide izolate din timusul bovin care au cca. 49 de aminoacizi. Sunt înrudite între ele şi cunoscute din punct de vedere al structurii primare.

Inhibă transmiterea neuromusculară, induce exprimarea markerilor specifici limfocitelor *T* la şoarecii *Nu/Nu* lipsiţi congenital de timus, activează precursorii celulelor *T* citotoxice, inhibă diferenţierea timpurie a limfocitelor *B* din precursorii medulari. Are importante funcţii imunoreglatoare.

*Factorul umoral timic (THF),* izolat din omogenat de timus de viţel prin ultracentrifugare, dializă, gel-filtrare pe coloană de Sephadex G-10 şi G-25, urmată de cromatografie pe schimbători de ioni. Este un polipeptid cu greutate moleculară 3220, în compoziţia căruia intră 4 resturi de Asp, unul de Thr, cinci de Ser, opt de Glu, doi de Pro, cinci de Gly, doi de Ala, unul de Leu, unul Lys şi doi de Arg. Reduce

exprimarea antigenului TL (*T* leukemia) caracteristic limfocitelor *T* imature şi celor leucemice, creşte reactivitatea *in vitro* a limfocitelor stimulate cu mitogeni, răspunsul limfocitelor la antigenele virale şi grefele de ţesut xenogen, activează funcţiile citotoxice antitumorale etc.

*Timostimulina (TS)* este de fapt un grup de polipeptide cu greutate moleculară 12 000 D. Se obţin din timusul de viţel prin extracţie cu acetat de amoniu încălzit la 70°C şi precipitare cu $SO_4(NH_4)_2$ saturat 45% şi 90%. Precipitatul se dizolvă în apă, este ultrafiltrat, trecut pe coloană de Sephadex G-25 şi apoi pe Sepharoză G-50. Din acest grup, mai bine cunoscute sunt două peptide: fracţiunea 6 B cu greutatea moleculară 5 600 D şi fracţiunea 7 B, similară unui alt hormon, ubiquitina.

TS induce exprimarea markerului Thy-1 la şoarece şi a receptorului E la subiecţii imunodepresaţi, cu toate că doze suboptimale pot inhiba formarea rozetelor E. Măreşte răspunsul limfocitelor la stimuli lectinici, întârzie dezvoltarea tumorilor transplantate la şoarece şi creşte rata de supravieţuire a animalelor la care s-au transplantat tumori.

*Factorul seric timic (TFS)* a fost izolat din serul de porc şi este activ asupra celulelor formatoare de rozete. Lipseşte în serul animalelor timectomizate sau a şoarecilor *Nu/Nu,* dar reapare după grefarea acestora cu timus, fapt care argumentează originea sa timică. Are greutatea moleculară 867 kD şi următoarea secvenţă primară: Glu-Ala-Lys-Ser-Glu-Gly-Ser-Asp. Induce exprimarea diferiţilor markeri pe celulele imature de şoarece şi om, activează *in vivo* şi *in vitro* limfocitele *T* citotoxice şi supresoare şi inhibă reacţiile de hipersensibilitate de tip întârziat şi imediat, în special cele declanşate de DNPB (dinitro-fluor-benzen).

*Timomodulina (lactoferina)* este un extract timic preparat prin hidroliză acidă (HCl) din timusul de viţel. Hidrolizatul este deproteinizat prin precipitare izoelectrică şi gel-filtrare pe coloane de Sephadex-G25 pentru a se elimina peptidele cu greutate moleculară >10 kD. Se obţine timomodulina, un amestec complex de polipeptide acide cu greutate moleculară mică, care este un preparat biologic activ, ce reglează maturarea limfocitelor pre-*T* la om şi şoarece şi modulează funcţiile limfocitelor *T* şi *B* mature.

*Ubiquitina (sau ubicvitina)* este un polipeptid cu greutate moleculară de 8,4 kD format din 74 de aminoacizi prezenţi în concentraţii mici în timus şi în majoritatea ţesuturilor animalelor şi chiar ale plantelor. Are marcante proprietăţi de stimulare a diferenţierii limfocitelor, fiind capabilă să inducă atât diferenţierea precursorilor limfocitari *T* cât şi a celor *B*. Acest hormon diferă de ceilalţi secretaţi de către timus prin faptul că este activ şi pentru precursorii *B*, că este produs şi de către alte ţesuturi şi nu este asociat cu dereglări în neurotransmisia musculară, cum este cazul timopoietinelor care, la om, sunt asociate cu *miastenia gravis*, o atrofie a muşchilor datorată unor alterări în sinteza şi prezenţa acetilcolinei la nivelul sinapselor neuro-musculare, asociată frecvent cu "timite" autoimune. Ubiquitina ar exercita controale la nivelul genomului celular, ar servi ca un semnal inductor al clivării proteinelor de către proteaze şi ar avea o activitate hormonală care ar induce diferenţierea precursorilor celulari în limfocitele *T* şi *B* imunocompetente.

*Bursina*, denumită iniţial *bursopoietina*, este un hormon de diferenţiere selectivă a limfocitelor *B*, sintetizat la nivelul bursei lui Fabricius. În componenţa sa există o secvenţă tripeptidică (Lys-His-Gly-) ce activează sinteza cGMP şi multiplicarea limfocitelor *B*, dar nu şi a celor *T*. Molecula are greutate mică şi acţionează selectiv, dar nu strict specific. Ea stimulează atât proliferarea limfocitelor *B* de pasăre, cât şi a celor de mamifere, cum ar fi linia Daudi de limfocite *B* umane.

Deci, timusul şi hormonii săi peptidici au rol central în maturarea celulelor *T* şi funcţionarea lor după maturare, preparatele timice, care variază ca proprietăţi biologice şi potenţă, fiind larg utilizate pentru restaurarea unor disfuncţii imune. În clinică, restaurarea şi accelerarea maturării precursorilor celulari s-a dovedit

salutară în cazul unor imunodepresii cu etiologie diferită, în unele boli neoplazice etc. De exemplu, timozina fracţiunea 5 are efecte salutare în tratamentul imunodeficitelor primare la om, cum ar fi atimia congenitală (sindromul Di George) sau alte imunodeficite asociate cu displazia sau hipopalazia acestui organ. Mai mult, inocularea ei *in vivo* stimulează proliferarea unor subpopulaţii de limfocite *T* reglatoare, cu funcţii ajutătoare, supresoare, contrasupresoare etc.

Există preparate comerciale, ca Leucotrofina, Imunotimul etc., care se administrează uzual în diferite imunodeficite şi în special la bolnavii cu neoplazii. Utilizarea lor se bazează în principiu pe acele efecte ale hormonilor timici care, în linii mari, controlează migrarea precursorilor timpurii din măduvă către timus, cum este cazul timopoietinelor I şi II, transformarea lor în timocite, activarea evoluţiei lor spre celule imunocompetente. Totuşi, administrarea acestor preparate comerciale trebuie făcută pe baze raţionale, după o prealabilă determinare a prezenţei sau absenţei acestor hormoni, a efectului lor *in vitro* asupra celulelor sistemului imun. În caz contrar, există riscul obţinerii unor rezultate nule sau chiar contrarii celor scontate.

## ROLUL CITOKINELOR ÎN REGLAREA HEMATOPOIEZEI

Există un sistem complex hematopoietic care menţine în limite normale populaţia celulară din circulaţia periferică. Elementele lui reacţionează prompt, stimulând sau inhibând proliferarea acestor populaţii în cazul devierii lor de la limitele normale. Ar fi o *hematopoieză constitutivă* generată de proliferarea normală a precursorilor celulari derivaţi din celula matcă, şi o *hematopoieză inductibilă* instalată în urma unor stimuli mai mult sau mai puţini nocivi.

În primul caz, refacerea elementelor figurate ale sângelui se face normal, prin înlocuirea automată a celulelor îmbătrânite cu celule tinere. În cel de al doilea caz, refacerea se face rapid, pentru a înlocui celulele moarte din cauza unor infecţii grave sau a unor diverse alte agresiuni. În acest caz, intervin rapid diferite citokine cu rol de factori de creştere, produse în cantităţi mari de către limfocitele *T* în special, macrofage, fibroblaste etc. Acestea acţionează direct asupra celulei matcă sau asupra hemocitoblaştilor angajaţi deja pe linii precise de maturare (fig. 101). Citokinele modulează hematopoieza în sensul activării sau inhibiţiei ei (tabelul 70). De fapt, interacţionează între ele stimulându-se reciproc, astfel că factorii de creştere care acţionează direct asupra progenitorilor hematopoietici sunt în realitate puţin numeroşi dar, pentru a putea fi generaţi, necesită influenţa unui număr mare de mediatori solubili (fig. 102). La rândul lor, multe citokine sunt sub influenţa altor factori care nu intră în categoria "limfokinelor" sau "monokinelor". De exemplu, glicoproteinele care pot lega unii ioni metalici, cum ar fi lactoferina, transferina sau izoferitina, au efecte supresoare asupra mielopoiezei, inhibând dezvoltarea celulei matcă sau producerea unor factori de creştere.

*Tabelul 70*

**Citokine cu efect modulator în hematopoieză**

| Efectul citokinei | Citokina implicată |
|---|---|
| Stimulator | IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6<br>G-CSF, M-CSF, GM-CSF |
| Inhibitor | IFN, TNF, TGF-$\beta$, $PGE_2$, lactoferina, transferina, feritinele |

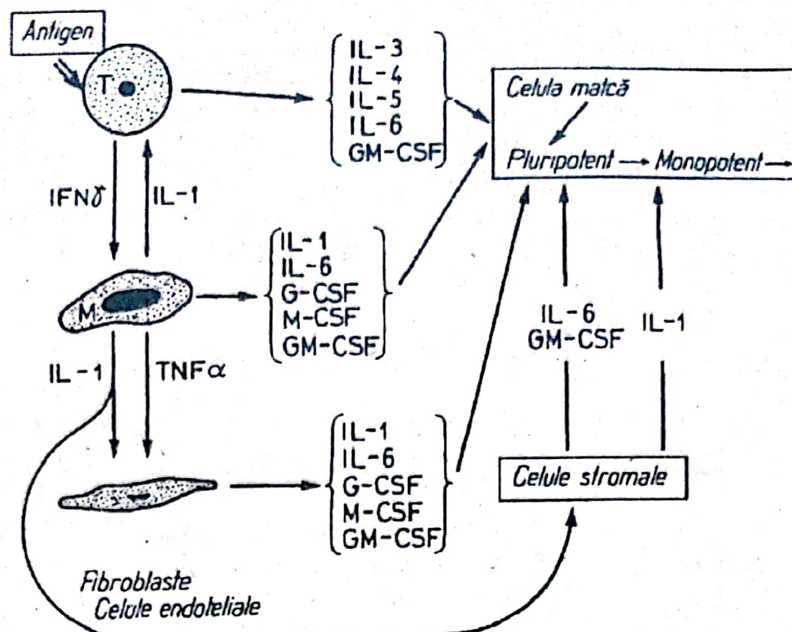



Fig.101. Intervenţia unor citokine în reglarea hematopoiezei. Limfocitele T stimulate specific de către antigen eliberează limfokine, care vor stimula atât macrofagele cât şi celulele matcă. Se realizează o "reţea" complexă de mediatori solubili care se condiţionează reciproc.

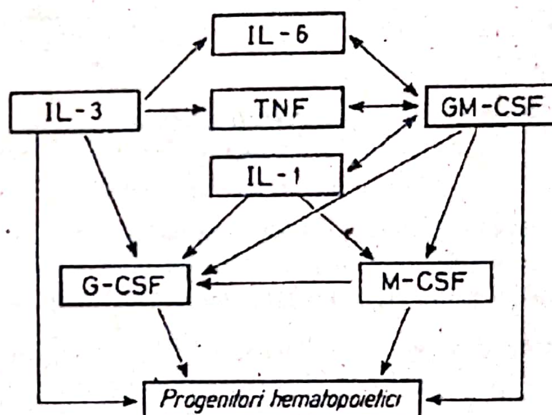



Fig.102. Diferite citokine care controlează proliferarea precursorilor hematopoietici.

În prezent se încearcă aplicarea în terapie a unor factori de creştere cum ar fi IL-3, G-CSF, M-CSF sau GM-CSF cu rezultate încurajatoare în pancitopeniile induse viral sau terapeutic (radioterapia şi chimioterapia antineoplazică).

## IMPLICAREA CITOKINELOR ÎN PROCESUL INFLAMATOR

Inflamaţia este un răspuns fiziologic violent la agresiunea brutală a unor agenţi mecanici sau infecţioşi. Leziunea tisulară apărută consecutiv acestei agresiuni stimulează eliberarea de factori chemotactici care vor "chema" diferite populaţii celulare ce vor contribui pe de o parte la eliminarea şi neutralizarea agresorilor, iar pe de altă parte, la vindecarea ţesutului lezat. În acest scop, celulele granulocitare, mieloide sau limfoide vor elibera local şi sistemic numeroase enzime proteolitice, molecule toxice de oxigen şi diverse citokine care vor influenţa funcţiile celulelor epiteliale, musculare, osoase sau ale sistemului imun. În felul

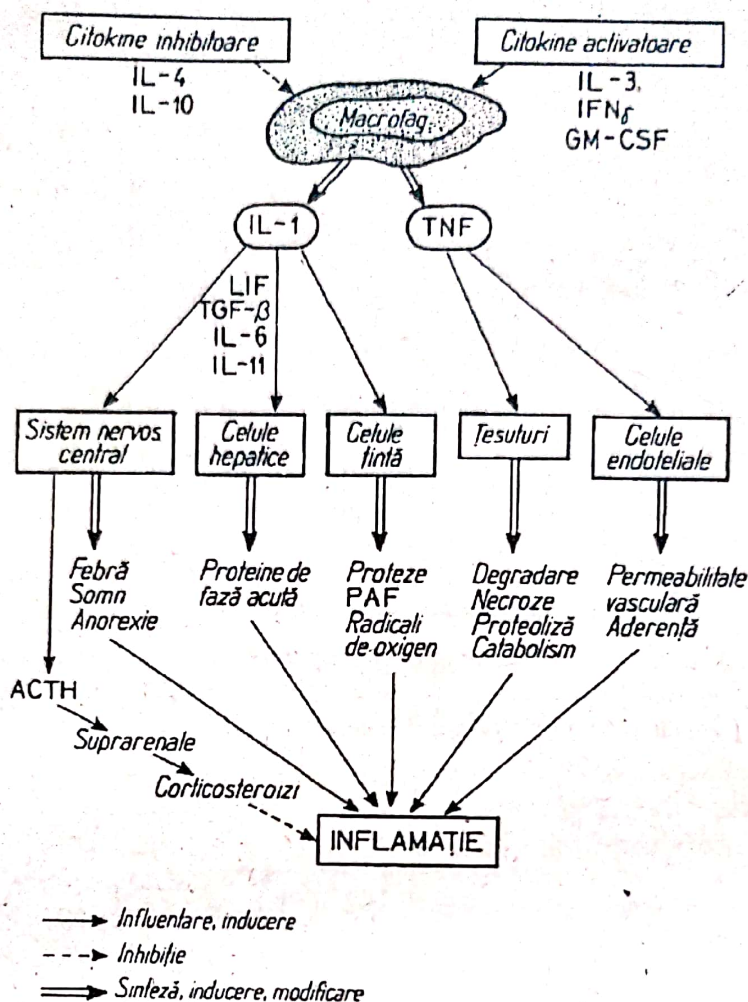



Fig.103. Intervenția diferitelor citokine în declanșarea și controlul procesului inflamator. Unele acționează ca factori inhibitori sau activatori asupra funcțiilor secretorii a macrofagelor, altele acționează asupra altor celule, țesuturi sau sisteme.

acesta se instalează o adevărată rețea funcțională care, prin mesajele transmise sau primite, stimulează procesul inflamator în vederea generării unui "disconfort" pentru agresor și, deci, a neutralizării lui (fig. 103).

Sub acțiunea mediatorilor care induc formarea unor citokine, ca de pildă IL-1 sau TNF, sunt activate unele funcții ale sistemului nervos, țesutului hepatic etc., ce conduc la eliberarea de proteine "inflamatorii" sau la generarea unor perturbări sistemice, cum ar fi febra, somnul etc., cu rol fiziologic bine definit. Unele citokine, ca IFN, IL-3, GM-CSF etc., pot amplifica procesul inflamator, mărind producția mediatorilor implicați direct în inflamație, de genul IL-1, IL-6, IL-8, TNF și alții. Altele, ca de pildă IL-4 sau IL-10, inhibă sinteza și eliberarea acestora.

Deci, și în inflamații, ca și în răspunsul imun specific, există un sistem de reglare și control al reacțiilor de apărare. Mecanismele de acțiune și celulele sau țesuturile țintă ale acestora sunt multiple. De exemplu, IL-1 și TNF$\alpha$ stimulează producerea de $PGE_2$ de către celulele endoteliale vasculare, fibroblaste, keratinocite, condrocite, macrofage, celulele hipotalamusului etc. La rândul lor, prostaglandinele măresc permeabilitatea vasculară realizată de IL-1, facilitând afluxul celular. Sub acțiunea stimulilor agresionali, monocitele, fibroblastele, celulele endoteliale etc. produc cantități mari de $O^{\cdot}_2$. Unii mediatori solubili, cum ar fi IL-1, IL-6, TNF etc., activează M-SOD (mangan-superoxid dismutază), care convertește $O^{\cdot}_2$ în $H_2O_2$,

pentru ca intervenţia ulterioară a catalazei să descompună $H_2O_2$ limitându-se astfel toxicitatea $H_2O_2$.

Dar tot IL-1 şi TNF activează eliberarea de colagenază de către fibroblaste, celule sinoviale sau condrocite, eliberare care va provoca alterări tisulare grave. Sub acţiunea lor, celulele endoteliale, cu rol cheie în favorizarea aderenţei celulare şi în realizarea pasajului transvascular al celulelor spre focarele inflamatorii, exprimă intens molecule de adeziune de genul ICAM-1, ELAM-1, VCAM-1 etc.

Interleukina-1, IL-6, IL-8, sau TNF induc sinteza de prostaglandine la diferite niveluri tisulare şi eliberarea de către leucocite şi macrofage a unor factori pirogeni (care vor genera febră) şi sinteza unei proteine S responsabilă de "somnul de fază lentă".

Tot la acest nivel, mediatorii amintiţi induc sinteza unui factor de eliberare a corticotropinei (CRF). Acest factor, acţionând asupra hipofizei, stimulează sinteza hormonilor adrenocorticoizi (ACTH) care, la rândul lor, vor antrena producerea glucocorticoizilor de către glandele suprarenale ce vor inhiba sinteza unor citokine, blocând reacţiile de apărare imună specifică sau nespecifică. Axul neuro-endocrin, hipofiză → ACTH → suprarenale → glucocorticoizi → depresie funcţională, este declanşat în condiţii de stres cu urmările sale benefice sau nocive asupra organismului.

Implicaţiile citokinelor în procesele inflamatorii demonstrează o dată în plus că organismul este un tot unitar care are funcţii complexe, aflate sub control riguros, control care de fapt realizează homeostazia.

## MARKERII CELULELOR SISTEMULUI IMUN

Termenul de "marker" semnifică un semn particular, o particularitate caracteristică unui grup de celule care permite deosebirea lor de alte celule. Ei pot fi morfologici, funcţionali sau antigenici, caracteristici unei populaţii sau mai multor populaţii celulare. Pot fi prezenţi pe doată durata vieţii celulei, sau pot fi exprimaţi numai în anumite stadii de dezvoltare a ei. De exemplu, capacitatea de aderare la sticlă sau de migrare *in vitro*, caracteristică atât macrofagelor cât şi granulocitelor PMN, dar nu şi limfocitelor, este un marker pentru primele două tipuri de celule. Limfocitele *B* neactivate au un reticul endoplasmic slab dezvoltat, pe când cele activate, adică plasmocitele secretoare de imunoglobuline, au reticulul bine dezvoltat. Şi markerii antigenici pot fi exprimaţi într-o anumită perioadă a dezvoltării ontogenice a celulei, pentru a dispărea în alte etape de dezvoltare a ei.

### MARKERI MORFOLOGICI ŞI FUNCŢIONALI

Sunt specifici pentru o singură populaţie sau pentru mai multe populaţii celulare (tabelul 71). De exemplu, macrofagele şi granulocitele PMN pot fi deosebite de limfocite atât morfologic cât şi funcţional prin mărimea celulei, forma nucleului, raportul nucleu/citoplasmă, aspectul marginii celulei (emiterea de pseudopode), migrarea *in vitro*, aderarea la sticlă, funcţia fagocitară etc. Dar, există deosebiri şi între macrofage şi granulocite, sau chiar între diferite populaţii de granulocite. Astfel, granulocitele PMN au un nucleu segmentat, caracteristic, de unde şi denumirea lor de "polimorfonucleare", care le deosebeşte de

macrofagele cu nucleu rotund. Dar celulele granulocitare se pot deosebi între ele prin caracterele tinctoriale ale granulelor citoplasmatice, care se colorează galben la neutrofile, roşu la eozinofile şi albastru la bazofile.

*Tabelul 71*

**Unii markeri morfologici şi funcţionali ai celulelor sistemului imun**

| Markerul | Prezent la nivelul celulelor | | | |
|---|---|---|---|---|
| | T | B | M | PMN |
| Existenţa nucleului segmentat | - | - | - | + |
| Granule citoplasmatice colorate diferit | - | - | - | + |
| Reţea dezvoltată de cisterne citoplasmatice | - | +* | - | - |
| Emitere de pseudopode | - | - | + | + |
| Funcţii fagocitare | - | - | + | + |
| Prezintă antigenul limfocitelor *T* | - | + | + | - |
| Prelucrează antigenul fagocitat | - | - | + | - |
| Receptori pentru eritrocite de oaie | + | - | - | - |
| Sinteza de anticorpi | - | + | - | - |
| Sinteza de TNF | + | + | + | + |
| Migrarea *in vitro* | - | - | + | + |
| Receptori *Fc* pe suprafaţa membranei | ± | + | + | + |
| Funcţii citotoxice mediate celular | + | - | + | - |
| Eliberarea de specii active de oxigen | - | - | + | + |
| Proliferare *in vitro* la stimul cu PHA | + | - | - | - |
| Proliferare *in vitro* la stimul cu PWM | + | + | - | - |

* caracter prezent numai la plasmocite;
caracter absent ( – ); slab exprimat ( ± ); bine exprimat (+); PWM = pokeweed mitogen; PHA = fitohemaglutinină.

Limfocitele *T* formează rozete cu hematiile de oaie, putând fi astfel deosebite şi separate prin centrifugare în gradient de densitate de celelalte celule ale sistemului imun. Mai mult, pe baza acestui caracter, poate fi identificată subclasa limfocitelor *T* supresoare ($CD8^+$) cu receptorul E termostabil. Aceste celule îşi păstrează capacitatea de rozetare E şi după incubarea lor timp de o oră la temperatura de +45°C, tratament în urma căruia limfocitele *T* ajutătoare ($CD4^+$) îşi pierd receptorul E. Corectitudinea diferenţierilor pe baza caracterelor morfologice între diferite celule depinde în mare măsură şi de tehnicile şi mijloacele folosite în acest scop. De exemplu, examinate la microscopul fotonic, limfocitele *T* şi *B* sunt practic identice din punct de vedere morfologic. Primele observaţii făcute acum 1-2 decenii la microscopul electronic scanning (SEM) sugerau că limfocitele *T* ar avea suprafaţa netedă, iar cele *B* ar avea numeroase vilozităţi, care ar putea reprezenta markeri morfologici pentru ele. Ulterior, însă, s-a stabilit că aceste vilozităţi nu sunt caracteristice celor *B* ci limfocitelor *T* şi *B* mature, cele tinere având membrana lipsită total sau parţial de vilozităţi, în funcţie de stadiul

lor de dezvoltare. O diferenţiere mai corectă se poate face cu ajutorul microscopului electronic cu transmisie directă (TEM), unde limfocitele *B* inactive au nucleul cu cromatină condensată, citoplasma bogată în ribozomi, raportul nucleu/citoplasmă mic, aparatul Golgi slab dezvoltat, iar reticulul endoplasmatic practic absent. Diferenţierea acestora de celulele *T* este totuşi discutabilă, dar este absolut sigură în cazul plasmocitelor cu nucleul excentric şi cu numeroase cisterne paralele. Dar nu toate subpopulaţiile celulare pot fi deosebite între ele pe baza caracterelor lor morfologice sau funcţionale, motiv pentru care, în prezent, mijlocul de elecţie folosit este cel de identificare a markerilor lor antigenici.

## MARKERI ANTIGENICI

Markerii antigenici sunt componente glicoproteice prezente la nivelul membranei plasmatice a unor celule, dar absente la alte celule. Identificarea lor se face cu ajutorul anticorpilor monoclonali sau prin clonarea moleculară cu stabilirea secvenţei genelor care codifică glicoproteinele marker. Au fost identificaţi determinanţi antigenici specifici limfocitelor *T*, limfocitelor *B*, celulelor *NK*, macrofagelor, timocitelor etc., operaţiunea de "inventariere" a lor, la care sunt antrenate numeroase laboratoare, continuând şi în prezent, motiv pentru care, din doi în doi ani, au loc lucrările congresului internaţional asupra "Antigenelor de Diferenţiere a Leucocitelor Umane" care analizează rezultatele şi standardizează nomenclatura. Conform acestei nomenclaturi, markerii antigenici au denumirea prescurtată CD, iniţialele cuvintelor englezeşti "cluster differentiation" care, traduse cu aproximaţie în limba română, ar însemna "diferenţierea din ciorchine", adică o deosebire a unui caracter dintr-o populaţie eterogenă de caractere. Tabelul 72 redă antigenele leucocitare umane cunoscute şi acceptate la Congresul Internaţional asupra Antigenelor de Diferenţiere a Leucocitelor Umane care a avut loc la Viena la data de 21-25 II 1989, cu completări ulterioare (1993).

*Tabelul 72*

**Clasificarea CD a antigenelor leucocitare umane**

| Marker | Greutate (kD) | Molecula | Proprietăţi, tipul de celule pe care este prezent markerul |
|---|---|---|---|
| CD 1a<br>CD 1b<br>CD 1c | 49<br>45<br>43 | gp<br>gp<br>gp | Pe 70-80% din timocitele din corticala timusului, dar nu pe *T* adulte, pe unele *B*, pe Langerhans din piele, pe celule dendritice. Sinteza lor este controlată de o grupă de gene (6 gene) care alcătuiesc o parte din familia de supergene imunoglobulinice |
| CD 2 | 50 | gp | Un lanţ monomorfic glicoproteic exprimat pe toate timocitele şi limfocitele *T* (pan *T* ). Recunoaşte moleculele de adeziune LFA-3 (*CD*58) şi este receptor E pentru eritrocitele de oaie. Prezent pe *T* al om, porc şi şoarece, pe unele *NK* la om. Leagă lectine |

| Marker | Greutate (kD) | Molecula | Proprietăţi, tipul de celule pe care este prezent markerul |
|---|---|---|---|
| CD 3 | 26 $\gamma$<br>20 $\delta$<br>20 $\varepsilon$<br>16<br>? | gp | Un complex de 5 lanţuri ($\gamma$, $\delta$, $\varepsilon$) asociate receptorului pentru antigen pe limfocitul *T*. Marker pan *T*. Leagă lectine |
| CD 4 | 59 | gp | Glicoproteină pe 25-35% din celulele *T* periferice. Marker pentru *T* helper / inductor, receptor pentru o gp de 120 kD de pe celulele infectate cu HIV |
| CD 5 | 67 | gp | Pan *T*, pe celule leucemice, pe unele *B* |
| CD 6 | 100 | gp | Pan *T*, pe un subset de *B*, absent pe *NK* |
| CD 7 | 40 | gp | Receptor *Fc* $\mu$ pe celulele *T*. Precede pe CD2 în dezvoltarea ontogenică în timus |
| CD 8 | 32 | gp | Marker pentru celulele *T* supresor/citotoxic. Pe 25-35% din celulele *T* periferice. Dimer $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$. Recunoaşte entigenele MHC de clasa I |
| CD 9 | 24 | p | Pe celule pre-*B* şi *B* mature. Ar fi antigen de activare, fără restricţie la o linie celulară. Prezent şi pe monocite. |
| CD 10 | 100 | p | Endopeptidază neutră, antigen CALLA, comun leucemiei limfoblastice acute pre-*B*, pre-*T* şi granulocitare (Common acute lymphoblastic leukaemia antigen) |
| CD 11 | 180 | gp | - CD11a este lanţul $\alpha$ al LFA-1, pe toate leucocitele |
| | 155 | gp | - CD11b este lanţul $\alpha$ al MAC-1. Receptor pentru iC3b prezent pe monocite, granulocite, pe unele subseturi *T* şi *B*, pe *NK* |
| | 150 | gp | - CD11c este lanţul $\alpha$ al proteinei 150/95 de pe monocite, granulocite, celule *NK*, trombocite, unele subseturi *B* |
| CD 12 | 90 - 120 | gp | Grup de molecule nedefinit, prezent pe celule mieloide şi pe trombocite |
| CD 13 | 150 | gp | Enzima de membrană N-aminopeptidază prezentă pe monocite şi granulocite |
| CD 14 | 50 - 55 | gp | Marker pe monocite |
| CD 15 | ? | ? | Pe macrofage, granulocite, celule Reed-Sternberg. Slab exprimat pe monocite. Implicat în procesul de fagocitoză, detectează un reziduu antilacto-N-fucose-pentosyl |
| CD 16 | 50 - 65 | gp | Receptor Fc$\gamma$ IIIR pentru IgG de pe eozinofile, macrofage, LGL, NK, K, PMN (Din familia FcR: vezi CD7, CD23, CD32) |
| CDw 17 | ? | ? | Lactosyceramida exprimată pe granulocite, monocite, trombocite |

| Marker | Greutate (kD) | Molecula | Proprietăţi, tipul de celule pe care este prezent markerul |
|---|---|---|---|
| CD 18 | 95 | p | Lanţul $\beta$ al subfamiliei moleculelor de adeziune II (LFA-1, Mac-1, p 150/95, CD11a, CD11b, CD11c) |
| CD 19 | 95 | gp | Un antigen timpuriu pre-*B* şi pan-*B* exprimat pe mai mult de 95% din celulele leucemice non-mieloide şi pe unii precursori mieloizi |
| CD 20 | 32 - 37 (33) | p | Pe unele celule pre-*B*, pe toate celulele *B* mature, dar nu pe plasmocite. Este o fosfoproteină cu extremităţile $NH_2$ şi COOH implantate în interiorul celulei, molecula având trei regiuni hidrofobe. Antigen cu restricţie la populaţia limfocitară *B*, implicat în activarea *B* |
| CD 21 | 140 | p | Receptor pentru C3d/EBV exprimat pe celulele *B* în repaus şi pe unele celule dendritice reticulare |
| CD 22 | 130 - 140 | gp | Prezent în citoplasma şi membrana celulelor pre-*B* pe suprafaţa unor celule *B*. Omolog unei glicoproteine asociate mielinei (MAG) |
| CD 23 | 50 | gp | Receptorul Fc$\varepsilon$RII cu slabă afinitate pentru IgE de pe celulele *B* activate, monocite activate, eozinofile, macrofage, trombocite, celule NK, celule dendritice foliculare, Fc$\varepsilon$ RIIa, Fc$\varepsilon$ RIIb |
| CD 24 | 45 | gp | Antigen prezent pe majoritatea celulelor pre-*B*, limfocitelor *B* şi pe granulocitele din leucemia acută non-mieloidă |
| CD 25 | 55 | gp | Lanţul $\beta$ al receptorului pentru IL-2 (Tac) de pe celulele *T* activate, limfocitele *B*, monocite şi eozinofile activate |
| CDW 26 | 120 | gp | Enzima dimetil-peptidază IV prezentă pe membrana limfocitelor *T* activate (T200) |
| CD 27 | 55 | p | Proteină exprimată pe celulele *T* mature. Dimeri de 50-55 kD şi polimeri de 120 kD |
| CD 28 | 44 | gp | Glicoproteină nepolimorfică implicată în activarea unor subseturi *T*. Este o moleculă de adeziune care leagă limfocitele *T* de cele *B* şi componenta de suprafaţă a unei căi de transducţie a semnalului |
| CD 29 | 130 | p | Subunitatea $\beta_1$ a integrinelor VLA |
| CD 30 | 120 | gp | Antigen prezent pe celulele *T* şi *B* activate, pe celulele Reed-Sternberg şi pe limfomul histiocitar Ki-1. Puternic exprimat pe celulele tumorale Hodgkin, prezent ca molecule solubile în serul bolnavilor Hodgkin, constituind marker pentru această maladie |
| CD 31 | 140 | gp | Pe celulele mieloide, endoteliale, pe limfocitele pre-*B*, pe trombocite, monocite, granulocite, pe unele celule *T* |
| CDw 32 | 40 | gp | Receptorul Fc$\gamma$ IIR de pe celulele mieloide monocite, polimorfonucleare, celule *B* |

| Marker | Greutate (kD) | Molecula | Proprietăţi, tipul de celule pe care este prezent markerul |
|---|---|---|---|
| CD 33 | 67 | gp | Antigen exprimat pe promielocitele din măduva normală şi pe monocite |
| CD 34 | 105 - 120 | gp | Exprimat pe celulele leucemice, limfoblastice şi mieloide, pe progenitorii mieloizi, eritrocitari şi limfocitari *B* |
| CD 35 | 220 | p | O parte din familia receptorilor pentru complement (CR1). Prezent pe granulocite şi monocite |
| CD 36 | 90 | gp | Pe monocite, trombocite, limfocite B, în leucemii mielomonocitare |
| CD 37 | 40 - 52 | gp | Pe limfocitele *B* mature, pe precursori *B*, celulele Kupffer, monocite. Slab exprimat şi pe unele limfocite *T* |
| CD 38 | 45 | p | Pe limfocitele *T* activate, pe timocite, plasmocite şi precursori *B* |
| CD 39 | 70 - 100 | gp | Pe majoritatea limfocitelor *B*, pe monocite |
| CD 40 | 45 - 50 | gp | O fosfoproteină pe celulele *B* mature şi imature, pe celulele carcinomatoase, dendritice, pe epiteliul timic. Omologie cu familia NGFR (receptor pentru creşterea nervilor). Anticorpii exercită un efect similar cu BCGF după acţiunea mitogenelor asupra celulelor *B*. Ligandul pentru CD 40 ar fi o gp 39 de pe celulele *T* activate |
| CD 41 | ? | gp | Pe trombocite şi granulocitele PMN. Este complexul II $\beta$– III $\alpha$ care aparţine familiei integrinelor. Leagă trombocitele la fibrină, fibronectină etc. |
| CD 42 a | 23 | gp | -Prezentă pe trombocite şi neutrofile |
| CD 42 b | 23 | gp | - Prezentă numai pe trombocite |
| CD 43 | 95 | gp | Pe limfocitele *T*, granulocite, monocite, ţesut neuronal. Este o leucosialină cu funcţii încă necunoscute |
| CD 44 | 80 - 95 | gp | Molecule puternic glicozilate, larg răspândite (leucocite, creier, hematii), cu funcţii insuficient cunoscute. Ar fi molecule de adeziune, receptor pentru acidul hialuronic |
| CD 45 | ? | gp | O glicoproteină exprimată exclusiv pe celulele hematopoietice, cu un domeniu citoplasmic mare, de cca. 705 reziduuri de aminoacizi şi două subdomenii cu similitudine cu tirozin-fosfataza. Iniţial denumită T 200. Este principala tirozin-fosfatază limfocitară |
| CD 45 RA | 220 | gp | Pe limfocitele *B*, pe monocite, granulocite, unele limfocite *T* |
| CD 45 RB | ? | gp | Pe limfocitele *B*, unele subsete *T*, pe monocite, granulocite |

| Marker | Greutate (kD) | Molecula | Proprietăţi, tipul de celule pe care este prezent markerul |
|---|---|---|---|
| CD 45 RO | 180 | gp | Pe limfocitele *B*, monocite, granulocite, pe unele celule *T*, în special pe cele de tip TCR $\gamma\delta$. Ar fi un marker pentru celulele de memorie |
| CD 46 | 65 / 56 | gp | Cofactor proteinic de membrană (MCP) prezent pe leucocite |
| CD 47 | 45 - 52 | gp | Marker cu o largă răspândire: pe toate celulele hematopoietice, pe celulele epiteliale, endoteliale, pe fibroblaste, celule tumorale etc. |
| CD 48 | 41 | gp | Pe leucocite |
| CDw 49b | 165 | gp | Lanţul $\alpha_2$ al VLA, prezent pe trombocite, limfocitele *T* etc. |
| CDw 49d | 150 | gp | Lanţul $\alpha_4$ VLA. Pe limfocite *T*, *B*, monocite, timocite |
| CDw 49e | ? | ? | Lanţul $\alpha_5$ al VLA |
| CDw 49f | 120 | gp | Lanţul $\alpha_6$ VLA pe limfocitele *T*, trombocite |
| CDw 50 | 148 / 108 | gp | Pe leucocite, timocite, limfocite *T* |
| CD 51 | 125 | gp | Lanţul $\alpha$ VNR pe trombocite (al integrinelor) |
| CDw52 | 21 - 28 | gp | Pe leucocite, dar în special pe limfocite şi pe monocite |
| CD 53 | 32 - 40 | gp | Pe leucocite |
| CD 54 | 80 - 114 | gp | Marker cu răspândire largă. Ar fi ICAM-1 de la nivelul celulelor activate, celulelor epiteliale, tumorale etc. |
| CD 55 | ? | ? | Factorul DAF (decay accelerating factor) de "accelerare a degradării" celulare |
| CD 56 | 220 - 135 | gp | Prezent pe limfocitele activate, pe celulele *NK*. Este factorul NKH-1 izoform lui N-CAM |
| CD 57 | 110 | gp | Este HNK-1 de pe celulele *NK*, limfocitele *T* citotoxice, unele subseturi de limfocite *B*, creier |
| CD 58 | 40 - 65 | gp | LFA-3 de pe leucocite, celule epiteliale. Este o moleculă legată la fosfatidil-inozitol (PI) |
| CD 59 | 18 - 20 | gp | O moleculă legată la fosfatidil-inozitol, larg răspândită (probabil un factor de restricţie a fracţiunilor C7 şi C8 ale complementului). Poate fi detaşată de PI de către fosfolipaza C (PLC) specifică PI |
| CDw 60 | ? | ? | Grupul NeuAc-NeuAc-Gal (diasolyl galactozo-terminal) pe limfocitele *T* ajutătoare şi *T* citotoxice |
| CD 61 | 105 | gp | Lanţul $\beta_3$ al integrinelor |
| CD 62 | 140 | gp | GMP-140 pe trombocite, granulocite PMN, monocite, celule endoteliale. Fixează PMN şi monocitele la ţesuturile lezate |
| CD 63 | 53 | gp | Puternic exprimat pe trombocite, monocite; slab exprimat pe limfocitele *T* şi *B* şi pe granulocite |

| Marker | Greutate (kD) | Molecula | Proprietăţi, tipul de celule pe care este prezent markerul |
|---|---|---|---|
| CD 64 | 75 | gp | Receptorul Fc $\gamma$ RI de pe monocite |
| CD 65 | ? | ? | Ceramide-dodecazaharid pe granulocite şi monocite |
| CD 66 | 180 - 200 | fp | O fosfoproteină puternic exprimată pe granulocite după activarea lor |
| CD 67 | 100 | p | Prezent pe trombocite şi granulocite |
| CD 68 | 110 | gp | Cel mai fidel marker imunohistologic de pe macrofage |
| CD 69 | 32 / 28 | gp | Antigene exprimate pe membrana limfocitelor *T* şi *B* în primele momente după activare |
| CDw 70 | 50 / 75 / 95 / 110 / 170 | ? | Markeri cu diferite greutăţi moleculare exprimat pe limfocitele *T* şi *B* activate, pe celulele Reed-Sternberg |
| CD 71 | ? | ? | Receptorul pentru transferină este bine exprimat pe toate celulele care se multiplică activ |
| CD 72 | 43 / 39 | gp | Un marker pan-*B* exprimat în stadii foarte timpurii de activare şi diferenţiere a acestora |
| CD 73 | 69 | p | Enzima ecto-5'-nucleotidază asociată structurilor de membrană a unor subpopulaţii de limfocite *T* şi *B* |
| CD 74 | 41 / 35 / 33 | ? | Molecule care recunosc lanţul invariabil (Li) asociat la MHC clasa II, prezent pe toate celulele B şi pe unele subpopulaţii de monocite |
| CDw 75 | 53 ? | p | Molecule exprimate pe celulele *B* normale, activate sau transformate neoplazic (limfomul Burkitt). Reacţionează cu glicosfingolipidele |
| CD 76 | 85 / 67 | gp | Exprimat pe limfocitele *B* mature şi pe unele limfocite *T* |
| CD 77 | ? | ? | Globothiosylceramida exprimată pe limfocitele *B* nestimulate |
| CDw 78 | ? | ? | Bine exprimat pe limfocitele *B*, slab pe monocite |
| CD 79 a | 33,40 | gp | Lanţul $\alpha$ al imunoglobulinei<br>Pe limfocitul *B* |
| CD 79 b | 33,40 | gp | B29 |
| CD 80 | 60 | gp | B7 pe limfocitul *B* |
| CD 81 | 22 | ? | Pe celulele *B* |
| CD 82 | 50-53 | ? | Pe limfocitele *B* |
| CD 88 | 42 | gp | Receptorul C5a pe celulele mieloide |
| CD 89 | 55-75 | gp | Fc$\alpha$R de pe celulele mieloide |
| CD 90 | 25-35 | gp | Antigenul Thy-1 pe timocite |
| CD 102 | 60 | ? | Molecula de adeziune ICAM-2 |
| CD 104 | 220 | p | Lanţul 4 al integrinelor |
| CD 106 | 100-110 | p | VCAM-1 (vascular cell adhesion molecules) de pe celulele endoteliale |

| Marker | Greutate (kD) | Molecula | Proprietăţi, tipul de celule pe care este prezent markerul |
|---|---|---|---|
| CDw119 | 90 | p | Receptor pentru IFNγ |
| CD 120 a | 55 | p | Receptor pentru TNF |
| CD 120 b | 75 | p | Receptor pentru TNF |
| CD 121 a | 80 | ? | Receptorul de tip I pentru IL-1 |
| CD 121 b | 68 | ? | Receptorul de tip II pentru IL-1 |
| CD 122 | 75 | ? | Receptorul pentru IL-2 (IL-2Rβ) |
| CDw 124 | 140 | gp | Receptorul pentru IL-4 |
| CD 126 | 80 | gp | Receptorul pentru IL-6 |
| CDw 127 | 75 | gp | Receptorul pentru IL-7 |
| CDw 128 | 58-67 | gp | Receptorul pentru IL-8 |
| CDw 130 | 130 | gp | Glicoproteina 130 SIG, receptor pentru IL-6 |

Legendă : FcR = receptori pentru Fc; FN = fibronectină; LFA = lymphocyte function associated (funcţie asociată limfocitelor); LGL = large granular lymphocytes (limfocite granulare mari); MAG = =myelin associated glycoprotein (glicoproteină asociată mielinei); NGF = neuronal growth factor (factorul de creştere a neuronilor); *NK* = natural killer (celule naturale ucigaşe); VLA = very late activation (activare foarte târzie); VNA = vitronectin antigen; w = caracteristici insuficient cunoscute; 180 - 200 = markerul are greutatea moleculară care variază între 180 şi 200 kD; 50 / 75 / 93 etc. = =markerul se poate găsi sub diferite stări de agregare moleculară cu greutăţi variind de la o formă de polimerizare la alta.

Unii dintre markerii antigenici enumeraţi, ca de pildă CD44, CD54, CD58 etc., pot fi exprimaţi pe suprafaţa mai multor populaţii de celule, pe când alţii, numai pe o singură populaţie sau chiar pe un grup restrâns de celule (tabelul 73).

*Tabelul 73*

**Exemple de markeri antigenici cu specificitate la o populaţie sau un număr restrâns de populaţii celulare**

| Celule pe care este exprimat markerul | Markerul exprimat |
|---|---|
| Limfocite *T* | CD1 (a, b, c), CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD26, CD27, CD28 etc. |
| Limfocite *B* | CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD40, CD72, CD73, CD74, CDw75, CD76 |
| Celule *NK* | CD48, CDw50, CD53, CD56, CD57 |
| Celule mieloide | CD13, CD14, CD15, CD64, CDw65, CD66, CD67, CD68 |
| Trombocite şi alte celule | CD9, CDw17, CD29, CD31, D36, CD41, CD42a, CD42b, CD47, CDw49b, CDw49d, CDw49f, CD51, CD55, CD61, CD62, CD63 |

Majoritatea lor sunt glicoproteine sau proteine cu diferite funcţii, dintre care multe au rol în transmiterea intracelulară a diferitelor semnale. De exemplu,

markerul 73 (şi posibil şi 75) este enzima ecto-5'-NT ancorată la nivelul membranei printr-un glicozil-fosfatidil-inozitol şi are un rol în maturarea funcţională şi proliferarea spontană a limfocitelor *B*, controlând tranziţia de la faza de multiplicare $G_0$ la faza $G_1$. Unii au diferiţi epitopi funcţionali, ca de pildă CD2, sau antigenici, ca CD4, alţii, cum ar fi CD20, au domenii hidrofobe sugerând o structură transmembranară similară canalelor ionice etc.

## MODULAŢIA MARKERILOR ANTIGENICI DE LA NIVELUL MEMBRANEI CELULARE

Prin modulaţia antigenică se înţelege alternanţa dintre exprimare şi lipsa de exprimare a unui antigen de pe suprafaţa celulei în diferite momente de existenţă a acesteia. Cu alte cuvinte, un antigen exprimat pe membrana plasmatică poate să dispară, pentru ca după un anumit timp să reapară, fenomenul putând fi evidenţiat cu ajutorul anticorpilor care "văd " antigenul respectiv. Expresia antigenelor pe suprafaţa limfocitelor poate fi modificată în relaţie fie cu diferite momente ale maturării celulei, fie în funcţie de diferitele influenţe pe care aceasta le suportă. Ca atare, antigenele de membrană, deşi sunt stabile, nu trebuie considerate inerte sau fixe, deoarece exprimarea lor poate varia atât calitativ cât şi cantitativ. Cauzele care generează şi condiţionează modularea antigenică sunt multiple şi încă insuficient cunoscute. În linii mari ele sunt *fiziologice, induse* accidental sau deliberat, şi *patologice*. Fiziologic, modulaţia antigenică însoţeşte diferenţierea celulelor în cursul maturării lor, în anumite stadii de dezvoltare celulele exprimă unii markeri antigenici pentru ca în altele să nu-i mai exprime. La om de exemplu, în cursul maturării lor, limfocitele *T* exprimă iniţial CD2, un marker al întregii populaţii de celule *T*. În stadii mai avansate, se exprimă secvenţial markerii CD3, CD4, CD8, CD5, CD1, celulele fiind deci $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD5^+$, $CD1^+$ pentru ca, odată ajunse la maturitatea funcţională, unele subpopulaţii să fie $CD2^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, adică limfocitele *T* h, iar altele, $CD2^+$ ,$CD3^+$, $CD8^+$, adică celulele *T* supresoare / citotoxice (tabelul 74).

Dar modulaţia antigenică poate fi şi cantitativă, nu numai calitativă. De exemplu, limfocitele de bou exprimă dens aloantigenul detectabil cu anticorpii T80 atunci când sunt încă în timus dar, după maturarea lor, o parte din celule, deşi sunt $T80^+$, exprimă totuşi slab acest marker.

Dintre cauzele induse pot fi amintite cele provocate de terapia cu antiseruri (cauze antigenice) sau cele provocate de diverse medicamente (cauze farmacologice). De regulă, la persoane cărora li s-au grefat organe sau celule, ca de pildă în transplantul renal, se administrează anticorpi anti-CD3 pentru a întârzia rejecţia organului prin blocarea funcţională a limfocitelor *T*. După un asemenea tratament, limfocitele pacienţilor exprimă pe membrana lor plasmatică toate antigenele cu excepţia celui pan-*T* (CD3) care a dispărut. Dacă se întrerupe administrarea anticorpilor, sau dacă limfocitele sunt cultivate *in vitro*, după 7-8 zile markerul CD3 reapare. Limfocitele $TL^+$ (*T* leukaemia sau antigenul pentru limfocitele *T* leucemice sau timocitele *T* imature), sau limfocitele *B* care exprimă pe membrană molecule de imunoglobulină, dacă sunt inoculate la animale care au fost imunizate anti-*T*L sau anti-imunoglobulină, îşi pierd reversibil antigenele respective. Dintre agenţii farmacologici responsabili de modulaţia antigenică, mai cunoscuţi sunt hormonii timici, cAMP, prostaglandinele, care pot mări exprimarea aloantigenului Thyl la şoarece sau pot induce apariţia lui pe celulele $Thyl^-$

din măduva osoasă etc. Dimpotrivă, indometacinul, un ihibitor al cAMP, descreşte exprimarea aloantigenului Thy-l.

*Tabelul 74*

**Diferenţe antigenice între limfocitele T naive (incompetente) şi de memorie (competente imunologic) (după A. N. Akbar şi col.)**

| Markerul antigenic | Limfocite T | |
|---|---|---|
| | Naive | De memorie |
| CD 2 | ++ | +++ |
| CD 7 | ++ | ± |
| CD18 / CD11a (LFA-1) | ++ | +++ |
| CD 25 (IL-2 R) | - | + |
| CD 26 | - | + |
| CD 29 | + | +++ |
| CD 44 (Pgp-1) | + | +++ |
| CD 45 RA | +++ | - |
| CD 45 RO | - | +++ |
| CD 54 (ICAM-1) | - | + |
| CD 58 (LFA-3) | + | ++ |
| MHC clasa II | - | + |
| p 75 (în IL-2 R) | - | ± |

Deci, modulaţia antigenică este un fenomen reversibil, dependent în primul rând de metabolismul celular. În afară de cauzele normale sau induse, modulaţia este observată în unele situaţii patologice cum ar fi hepatita cronică activă, myaştenia gravis, diverse imunodeficite congenitale, când limfocitele pot pierde sau pot exprima mai mulţi markeri antigenici decât exprimă în mod normal. De exemplu, pe aceeaşi celulă *T* sunt exprimate aloantigenele CD4 şi CD8 care, în mod normal, se găsesc pe subpopulaţii de celule diferite, respectiv pe *T* h şi *T* c / s.

Modulaţia antigenică poate fi salutară sau poate avea efecte nedorite. Este salutară în cazul unor autoagresiuni, când unele limfocite devin reactive faţă de unele antigene exprimate pe alte limfocite sau celule din componenţa organismului propriu. Dacă însă aceste celule "ţintă" îşi "ascund" antigenele, limfocitele agresoare nu le mai recunosc ca ţintă şi procesul autoagresiv nu mai are loc.

Dar, în cazul unor leucemii sau al altor boli în care celulele unui ţesut exprimă antigene de neoformaţie, de exemplu antigene tumorale, terapia cu anticorpi devine ineficientă, deoarece aceste antigene sunt modulate, dispar, celula devenind indiferentă la acţiunea terapeutică a anticorpilor.

# MOLECULE DE ADEZIUNE

În relaţiile dintre celulă şi diferite componente străine, un rol esenţial revine atât unor caracteristici particulare ale unor componente străine de celulă, cunoscute sub denumirea de "liganzi", cât şi complexelor moleculare de pe suprafaţa membranei plasmatice care recunosc liganzii. De altfel, distincţia dintre liganzi şi moleculele care îi recunosc este relativă, deoarece un ligand de pe o celulă poate fi receptor pentru o structură exprimată pe altă celulă şi care poate funcţiona ca moleculă de adeziune. Tot ceea ce este recunoscut şi fixat pe membrana unei celule este "ligand". Este cazul antigenelor, lectinelor, hormonilor, fibronectinei (FN), lamininei (LM), colagenului etc. Complexele moleculare care recunosc liganzii ar putea fi împărţite în două mari grupe: a) molecule de adeziune şi b) receptori de membrană.

**Fibronectina** (FN) reprezintă o subfamilie de molecule formată din subunităţi polipeptidice distincte, existente ca dimer sub diferite variante, în plasmă, placentă, lichid amniotic şi pe suprafaţa unor celule. FN din plasmă are un "segment de conexiune" cu un situs de ataşare care interacţionează cu moleculele de adeziune din familia integrinelor ($\alpha 4 \beta 1$), fiind distincte de tripeptidul Arg-Gly-Asp (RGD) recunoscut de integrina $\alpha 5 \beta 1$ (fig. 104).

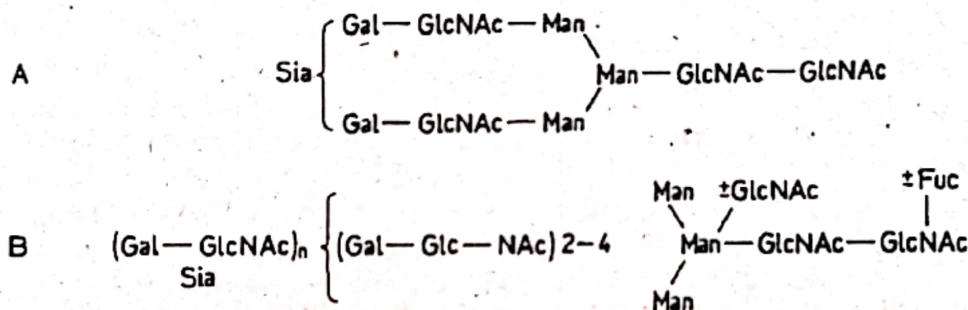



Fig.104. Structura chimică a fibronectinei existentă în plasmă (A) şi în placentă sau în lichidul amniotic (B).

**Laminina (LM)** este un component ubicuitar al membranelor celulare, în special al celor tumorale, cu trei lanţuri polipeptidice (A, $B_1$ şi $B_2$) a căror exprimare diferenţiată creează izoforme moleculare multiple (fig. 105). Este recunoscută de integrinele VLA-1, VLA-3 şi VLA-6.

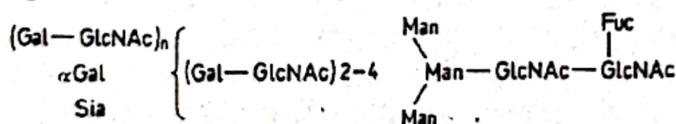



Fig.105. Structura chimică a moleculei de laminină.

Moleculele de adeziune sunt exprimate pe suprafaţa celulelor care mediază selectiv procesele de legare a unor substraturi la membrana celulară sau de aderarea intercelulară, deosebindu-se din acest punct de vedere de receptori care mediază legarea, ei recunoscând alte structuri şi nefiind recunoscuţi ei de acestea.

Până în prezent sunt cunoscute trei familii de molecule de adeziune, şi anume: a) imunoglobulinele, b) integrinele şi c) selectinele (tabelul 75). Acestea sunt implicate în interacţiuni de genul celulă-celulă, celulă-moleculă sau celulă-matrice celulară (FN, LM colagen). Angajarea în aceste interacţiuni a suprafeţei celulare duce la transmiterea semnalelor primite şi la declanşarea unor evenimente care pot modifica fenotipul, exprimarea produselor unor gene, starea de activare sau mobilitatea celulei etc.

**Familiile și subfamiliile moleculelor de adeziune: funcții și substraturi la care aderă (după R.E. Hemler)**

| Familia | Subfamilia | Există pe | Membri | Subunități | Aderă la |
|---|---|---|---|---|---|
| Integrine | I (VLA) | Numeroase populații celulare | VLA-1 | $\alpha 1 \beta 1$ | LM, Co |
| | | | VLA-2 | $\alpha 2 \beta 1$ | LM, Co |
| | | | VLA-3 | $\alpha 3 \beta 1$ | LM, Co, FN |
| | | | VLA-4 | $\alpha 4 \beta 1$ | FN, p-HEV |
| | | | VLA-5 | $\alpha 5 \beta 1$ | FN |
| | | | VLA-6 | $\alpha 6 \beta 1$ | LM |
| | II (LAF) | Leucocite | LFA-1 | $\alpha L \beta 2$ | ICAM-1, ICAM-2 |
| | | | Mac-1 | $\alpha M \beta 2$ | Fx, iC3b,LPS, FB |
| | | | p 150,95 | $\alpha x \beta 2$ | iC3b |
| | III (citoadezine) | Trombocite, celule endoteliale | IIb-IIIa<br>VNR | $\alpha B \beta 3$<br>$\alpha v \beta 3$ | FN, FB<br>VN, FB, TSP |
| | | Celule canceroase | VNR ALT | $\alpha v \beta 5$ | VN, FN, RGD |
| Selectine | - | Numeroase populații celulare | PADG-EM | (P-selectine) | Trombocite |
| | | | ELAM-1 | (E-selectine) | Cel. endot. |
| | | | LAM-1 | (L- selectine) | Leucocite |
| | | | Mel-14 | (L-selectine) | Leucocite |
| Imunoglobuline | TCR | Limfocite *T* | $\alpha, \beta\ (\gamma\delta)$ | - | Antigene |
| | sIg | Limfocite *B* | $\mu, \delta, \varepsilon, \gamma, \alpha$ | - | Antigene |
| | CD2 | Limfocite *T* | - | - | LFA-3 |
| | LFA-3 | Celule APC | - | - | CD2 |

*Abrevieri:* APC=celule prezentatoare de antigen; ELA=endothelial cell adhesion molecule (moleculă de adeziune la celule endoteliale); FB=fibrinogen; FN=fibronectină; FX=factor X; GMP=granule membrane protein (proteină granulară de membrană); ICAM=molecule de adeziune intercelulară (intercellular adhesion molecule); LAM=leukocyte adhesion molecule (molecule de adeziune a leucocitelor); LFA=lymphocyte function associated (asociat funcției leucocitare); LM=laminină; Mel=moleculă de adeziune celulară; PAGD - EM=platelet activation-dependent granule external membrane protein (activator al trombocitelor, dependent de proteina granulară de membrană); p - HEV=Peyer patch-Human Endothelial Venules (celule endoteliale ale venulelor din plăcile Peyer); sIg=imunoglobulină de suprafață (receptor de membrană de natură imuno-globulinică); RGD=Arg-Gly-Asp; TCR=T cell receptor (receptor pentru antigen pe limfocitele T); VLA=very late activation (activare foarte târzie); VN=vitronectină; VNR=vitronectin receptor (receptor pentru vitronectină).

*Notă:* VLA-4 este intens exprimată pe limfocitele T, mediind semnale implicate în proliferarea acestora și acumularea de cAMP.

Aceste evenimente reglează activitatea funcţională şi implicit exprimarea moleculelor de adeziune sau a receptorilor de membrană, dintre care unii, ca de pildă receptorii *Fc* sunt implicaţi în evenimentele de aderare.

**Imunoglobulinele** există fie ca molecule integrate în membrana limfocitelor *B* cu funcţie de receptori pentru antigene, fie ca molecule solubile prezente în plasmă şi în umorile organismului, care se fixează prin *Fab* la suprafaţa unor celule ţintă şi prin *Fc* la receptorii *Fc* de pe membrana unor celule efectoare (fig. 106). Prin realizarea conjugatelor ţintă-efector, sunt activate mecanismele litice anticorp-dependente sau funcţiile fagocitare ale macrofagelor (fagocitoză "opsonică").

O caracteristică principală a moleculelor de adeziune este modul de alcătuire a lor: toate sunt dimeri formaţi din lanţurile $H+L$ în cazul imunoglobulinelor sau din lanţurile $\alpha+\beta$ în cel al integrinelor sau selectinelor.

**Integrinele** sunt o familie larg răspândită, alcătuită din cel puţin 14 heterodimeri $\alpha\,\beta$ împărţiţi în trei subfamilii distincte: a) subfamilia $\beta$ 1 conţine cel puţin 6-8 membri (VLA 1-6); b) subfamilia $\beta 2$ cu trei membri (LFA-1, Mac-1 şi pl 50,95) şi c), cu subfamilia $\beta 3$ sau a "citoadezinelor" care are minimum doi membri. Aceste molecule existau la formele primare de viaţă şi s-au păstrat nemodificate în cursul evoluţiei filogenetice. Şi în prezent ele există la *Drosophylla,* nematode, peşti, păsări şi bineînţeles la mamifere la care sunt exprimate pe celulele embrionare, cartilaje, celulele endoteliilor vasculare, pe leucocite, trombocite etc. Sunt glicoproteine de suprafaţă care, în prezenţa ionilor bivalenţi, a temperaturii corespunzătoare şi a microfilamentelor membranare, mediază adeziunea la fibronectină, laminină, glicolipide, glicoproteine etc. la care recunosc, printre altele, un segment comun din constituţia polipeptidelor cu secvenţa Arg-Gly-Asp (RGD). Greutatea lor moleculară variază între 95 şi 200 kD, în cadrul familiei existând 8-9 subunităţi $\alpha$ şi 4-5 subunităţi $\beta$ care,după modul în care este implicat lanţul, realizează cele trei subfamilii menţionate anterior (v. tabelul 75). Toate subunităţile $\alpha$ au un domeniu citoplasmatic foarte scurt, cu 15-53 de reziduuri de aminoacizi şi unul extracelular lung (1050 de reziduuri) conţinând 18-24 Cys care realizează legături disulfidice intralanţ şi numeroase bucle mici. Domeniul extracelular al lanţului $\beta$ este ceva mai scurt (667 aminoacizi), dar cu mai multe reziduuri Cy (56) şi, deci, cu un număr mai mare de legături disulfidice, care-i conferă un înalt grad de rigiditate. Pentru exprimarea integrinelor la suprafaţa celulelor, este obligatorie asocierea celor două subunităţi $\alpha$ şi $\beta$, a căror sinteză este controlată de gene situate pe cromozomi diferiţi (tabelul 76).

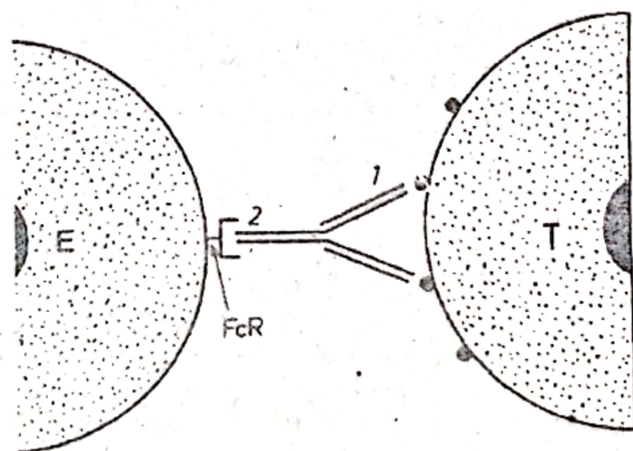



Fig.106. Modalităţi de fixare a imunoglobulinelor la diferite celule. Prin Fab (1) molecula recunoaşte specific antigenele de pe celula ţintă (T), realizând o fixare "imună". Prin Fc (2) se leagă "citofil" la receptorul pentru Fc (FcR) de pe celula efectoare (E). În acest mod, se poate forma o "punte" între celulele T şi E, cu activarea potenţialului citotoxic al celulei efectoare E.

Tabelul 76

**Greutatea moleculară şi poziţia genelor care controlează sinteza subunităţilor familiei de integrine**

| Subunităţile $\alpha$ | Greutatea moleculei (kD) | Gena este cromozomul | Subunităţile $\beta$ | Greutatea moleculei (kD) | Gena este cromozomul |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 210 | 5 | 1 | 130 | 10 |
| 2 | 165 | 5 | 2 | 95 | 21 |
| 3 | 130 | 17 | 3 | 105 | 17 |
| 4 | 150 | ? | 4 | 220 | ? |
| 5 | 135 | 12 | 5 | 110 | ? |
| 6 | 120 | ? | | | |
| 1 | 180 | 16 | | | |
| M | 170 | 16 | | | |
| X | 150 | 16 | | | |
| V | 125 | 2 | | | |
| B | 120 | 17 | | | |

Moleculele aceleiaşi subfamilii pot fi exprimate diferenţiat pe celule, în funcţie de tipul, vârsta sau starea de activare a acestora (tabelul 77). Importante pentru realizarea contactelor intercelulare şi declanşarea unor reacţii imune sunt integrinele subfamiliei II alcătuite din trei grupe de glicoproteine înrudite structural: LFA-1 (CD 11a / CD18), Mac-1(CD11 b / CD 18) şi p 150, 95 (CD11 c / CD18). Ele mediază aderarea limfocitelor la diferite ţinte sau substraturi, interacţia fagocitelor cu microbii opsonizaţi prin anticorp sau complement etc. Toate se compun din două lanţuri polipeptidice legate necovalent: o subunitate $\alpha$ unică (CD 11a-c) şi alta comună $\beta$ (CD18). Genele care codifică pentru lanţul $\alpha$ ale acestei subfamilii sunt situate pe braţul scurt al cromozomului 16.

Tabelul 77

**Intensitatea exprimării moleculelor de adeziune din subfamilia I a integrinelor pe suprafaţa unor celule**

| Celula care exprimă moleculele de adeziune | Moleculele de adeziune exprimate | Intensitatea exprimării |
|---|---|---|
| Timocite | VLA - 1;2;3;5 | Cantităţi neglijabile |
| | VLA - 4 | Bine exprimat |
| | VLA - 6 | Slab exprimat |
| Limfocite *T* | VLA - 1;2 | Foarte slab exprimat |
| | VLA - 3 | Slab exprimat |
| | VLA - 4 | Moderat exprimat |
| | Vla - 5;6 | Bine exprimat |

| Celula care exprimă molecule-le de adeziune | Moleculele de adeziune exprimate | Intensitatea exprimării |
|---|---|---|
| Limfocite *T* activate | VLA - 1;2 | Bine exprimat |
| | VLA - 3 | Slab exprimat |
| | VLA - 4 | Moderat exprimat |
| | VLA - 5;6 | Bine exprimat |
| Monocite | VLA - 1;3 | Slab exprimat |
| | VLA - 2;4;5 | Moderat exprimat |
| | VLA - 6 | Predomină |
| Trombocite | VLA - 1;3;4 | Nedetectabil |
| | VLA - 5 | Slab exprimat |
| | VLA - 2;6 | Moderat exprimat |

LFA-1 recunoaşte ICAM-1 sau ICAM-2, molecule larg răspândite şi inductibile prin citokine inflamatorii. Prin structură, LFA-1 aparţine familiei integrinelor dar, spre deosebire de alte integrine, această moleculă este exprimată predominant pe leucocite. Aderarea la liganzi este condiţionată de temperatură, energie, prezenţa cationilor bivalenţi (în special $Mg^{2+}$) şi existenţa unui citoschelet celular intact.

Ar exista două forme moleculare, una inactivă şi alta activă. Leucocitele proaspăt izolate, deşi exprimă mult LFA-1 şi ICAM-1, nu autoaglutinează pentru că moleculele LFA-1 sunt inactive . Tratarea cu anticorpi anti LFA-1 (NKI-L16) sau cu PMA (forbol miristat-acetat), care alterează conformaţia moleculei de adeziune ca urmare a fosforilării lanţului $\beta$, le transformă în molecule active. LFA-1 realizează un contact specific cu ICAM-1 sau ICAM-2 de pe ţintă, după care urmează recunoaşterea specifică a antigenului de către receptorul pentru antigen. Dacă celula, de pildă cea citotoxică, nu recunoaşte specific antigenul prin complexul TCR-CD3, atunci legătura LFA-1 cu ICAM se desface şi celula *T* c se desprinde de pe ţintă. Dacă însă legătura specifică are loc, atunci complexul CD3 transmite semnale activatoare la LFA-1 care vor conduce la fosforilarea subunităţii $\beta 2$ şi la medierea unor legături de mare afinitate (fig. 107). Interacţiile LFA-1 cu ligandul pot fi reglate prin trei modalităţi diferite: a) prin creşterea sau scăderea numărului de molecule de adeziune exprimate pe suprafaţa celulei; b) prin maturarea proceselor de activare a acestor molecule şi c) prin activarea specifică a LFA-1.

În reglarea activităţii funcţionale a LFA-1 un rol important are legarea TCR la epitop, proces în care, ca urmare a semnalelor induse intracelular, creşte aviditatea LFA-1. Deci, adeziunea realizată de LFA favorizează recunoaşterea antigenului de către TCR care, la rândul său, va stimula aviditatea LFA-1, astfel încât limfocitele *T* inactive, care exprimă molecule LFA-1 de joasă aviditate, odată activate, vor exprima molecule de mare aviditate. Întregul proces favorizează aderarea limfocitelor *T* la endotelii, proliferarea lor, activarea limfocitelor *B* via limfocite *T* etc.

*Mac-1 (CR3, iC3b receptor)* este un marker pentru celulele mieloide format dintr-o subunitate $\alpha$ de 170 kD şi una $\beta$ de 95 kD identică celor de la LFA-1 şi p 150,95. Exprimată pe macrofag, recunoaşte FB, iC3b, un polipeptid de pe suprafaţa celulelor endoteliale care ar facilita aderarea granulocitelor PMN şi

extravazarea lor în timpul proceselor inflamatorii, precum şi o glicoproteină de 63 kD de pe suprafaţa *Leishmaniei*. Pentru legarea acestora, este necesară prezenţa $Ca^{2+}$ sau $Mg^{2+}$.

*p 150,95*, exprimată pe macrofage, limfocite *T* citotoxice şi probabil pe alte subpopulaţii *T*, este un receptor pentru complement care leagă iC3b. Favorizează aderarea neutrofilelor şi monocitelor la endotelii, formarea conjugatelor limfocite *Tc* - celulă ţintă, chemotactismul şi fagocitoza celulelor înzestrate cu această funcţie. Toate aceste trei populaţii moleculare realizează două funcţii majore: a) adeziunea intercelulară; b) transducerea semnalelor de la exterior spre interiorul celulei.

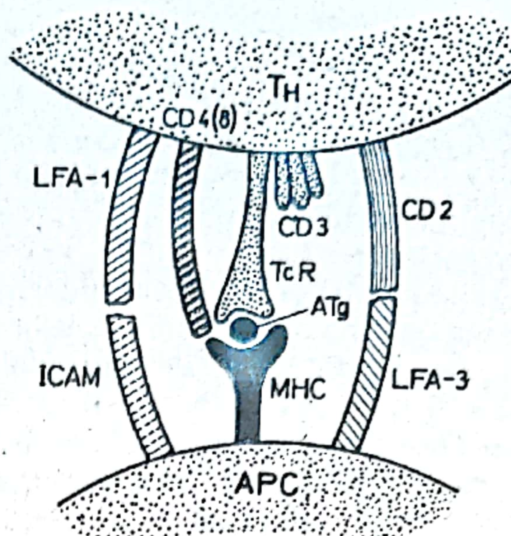



Fig.107. Stabilirea de conexiuni între celula prezentatoare de antigen (APC) şi limfocitul T (Th). Celula APC prezintă antigenul (Atg), care este recunoscut specific de către receptorul pentru antigen (TcR) al celulei T. Prin CD4 sau CD8, limfocitul T recunoaşte antigenele complexului major de histocompatibilitate (MHC) ale APC, iar prin LFA-1 şi CD2, fixează ICAM-1 (sau ICAM-2), respectiv LFA3 ale APC.

Integrinele intervin în relaţiile dintre celulele mobile şi cele fixe endoteliale. Ele sunt atât pe suprafaţa celulelor normale, ca de pildă pe limfocite, cât şi pe suprafaţa celulelor tumorale, în curs de metastazare, ambele populaţii celulare având unele caracteristici comune, cum ar fi capacitatea de deplasare, de proliferare şi de aderare. Celulele tumorale exprimă diferiţi membri ai familiilor de integrine care ar fi implicaţi în aderarea lor la ţesuturile normale şi, deci, în procesul de metastazare.

Acest proces este similar cu cel de "homing" al precursorilor limfocitari, celula tumorală preferând un anumit loc pentru aderare şi colonizare, fapt care sugerează existenţa la nivelul lor a unor receptori pentru "homing". Un astfel de receptor ar fi o proteină de 85 kD numită CD44, prezentă atât la limfocite cât şi la suprafaţa celulelor tumorale, indiferent de caracterul lor de metastazare.

**Selectinele** sunt o familie de glicoproteine de adeziune, alcătuită din molecule *L* exprimate pe leucocite, *E* pe celulele endoteliale şi *P* pe trombocite şi celulele endoteliale. Se leagă prin oligozaharide la receptorii pentru ele fiind implicate în evenimentele timpurii ale răspunsului inflamator acut când realizează interacţiuni de aderare iniţială a leucocitelor la endoteliul vascular (vezi fig. 37). Într-un stadiu ulterior, sunt recrutate *b* integrinele *CD*11/*CD*18 şi *ICAM*1/*ICAM*2 care realizează interacţiuni adezive ferme cu rol în asigurarea migrării leucocitelor în ariile extravasculare. Ar mai interveni în orientarea limfocitelor spre ariile lor de la nivelul organelor limfoide secundare, adică spre "domiciliul" lor (homing). Numele derivă de la termenii "select" (a selecţiona, a alege) şi "lectine". Moleculele au un domeniu $NH_2$ terminal cu 117-120 de reziduuri de aminoacizi, analog cu lectinele de tip C, dintre cele mai bine cunoscute fiind GMP-140 (CD 62), LAM-1, Mel-14, PAGD-EM şi ELAM-1.

*Selectina GMP-140*, exprimată pe trombocite şi pe celulele endoteliale asigură legarea monocitelor şi granulocitelor PMN la ţesuturile lezate. Moleculele au un segment extracelular cu un domeniu lectinic LAM-1, un receptor "pentru acasă" (homing), care asigură aderarea leucocitelor la endoteliile vasculare din ganglionii limfatici, splină etc. precum şi migrarea PMN la locul inflamaţiei.

*Mel-14* acţionează foarte timpuriu în adeziunea granulocitelor PMN la endoteliu, PAGD-EM, asigură interacţiunea celulă-celulă necesitând însă un ligand intermediar *(trombospondina)*. Tot în acest grup este inclus şi ELAM-1, sintetizat de celulele endoteliale ca răspuns la agenţii inflamatori. Structura moleculei de ELAM-1 diferă de la un tip la altul. De exemplu, anticorpii care recunosc ELAM-1 de pe membrana celulelor *NK* nu recunosc aceleaşi molecule de pe suprafaţa granulocitelor.

Din punct de vedere funcţional, moleculele de adeziune controlează morfogeneza celulară, adeziunea celulelor la diferite substraturi şi vindecarea rănilor, absenţa lor generând grave alterări ale stării de sănătate.

Există persoane cu deficit congenital de aderare a leucocitelor (LAD=leukocyte adhesion deficiency). Defectul este la nivelul genei care controlează sinteza lanţului $\alpha$, astfel că nu se mai pot forma molecule de $\beta$2-integrine (LFA-1 şi Mac-1). Clinic, acest deficit se exprimă prin leucocitoză, mobilizarea deficitară a granulocitelor PMN, infecţii recurente, vindecări întârziate ale rănilor etc., provocate de profunde modificări ale chemotaxiei PMN şi monocitelor, ale aderării la substrat, ale funcţiilor lor fagocitare etc. Locomoţia granulocitelor PMN este dependentă de LAF-1, Mac-1, p150,95. Persoanele la care aceste molecule lipsesc au granulocite PMN care pot migra normal în gel de colagen, dar nu pot traversa suprafeţele bidimensionale.

De aici concluzia că procesul contractil al celulelor şi, deci, şi procesul locomotor sunt independente de adeziune, aceasta devenind importantă doar ca factor de "agăţare" a unui punct de pe suprafaţa endoteliului vascular, care să-i permită aducerea în apropiere a extremităţilor celulare opuse punctului respectiv (vezi fig. 37, 38). În acest fel, prin aderarea în diferite etape, asociate cu contracţii şi modificări la nivelul citoscheletului, se realizează deplasarea celulei şi diapedeza ei. În procesele inflamatorii, ca de altfel şi în alte procese fiziologice, interacţiunile celulare au un rol extrem de important. De exemplu, trombocitele au diferite tipuri de receptori care permit aderarea, împrăştierea sau agregarea lor la locul leziunii vasculare.

Receptorii de pe celulele endoteliale, leucocite, trombocite etc. controlează interacţiile celulare responsabile de migrarea celulei la locul infecţiei. Toate acestea se realizează prin molecule de adeziune din superfamiliile imunoglobulinelor, integrinelor, selectinelor sau receptorilor *Fc*. Dar, exprimarea lor funcţională recunoaşte o anumită cinetică. Pentru a asigura migrarea leucocitelor spre locul inflamaţiei, moleculele de adeziune din familiile de imunoglobuline şi integrine acţionează în interdependenţă cu selectinele. De pildă, $\beta$2 integrinele (LFA-1 şi Mac-1) realizează aderarea leucocitelor la receptorii celulelor endoteliale, incluzând membri ai superfamiliei imunoglobulinelor cum ar fi ICAM-1 şi ICAM-2 (pacienţii lipsiţi de $\beta$2 integrină prezintă sindromul LAD). În momentul în care celulele endoteliale încep să fie activate funcţional, legarea acestor integrine încetează, intervenind superfamilia selectinelor alcătuită din trei grupe de molecule: L-selectine, P-selectine şi E-selectine. După clivarea enzimatică a integrinelor, legarea leucocitelor se face prin L-selectine, respectiv prin LAM-1 exprimate pe cca. 70% din granulocitele PMN circulante. L-selectinele mobilizează granulocitele spre locul inflamaţiei, realizând o aderare slabă care permite "rularea" celulelor sub efectul sangvin de-a lungul pereţilor vasculari. După activarea celulelor endoteliale, LAM-1 sunt clivate enzimatic "lăsând locul" liber E-selectinelor şi P-selectinelor. E-selectinele (ELAM-1) se exprimă numai pe

celulele endoteliale stimulate de la locul agresiunii, dar nu şi pe cele normale, nestimulate. Ele sunt receptori pentru PMN şi macrofage, dar nu şi pentru limfocite, putând lega unul sau mai mulţi liganzi sialilaţi, fucosilaţi etc. Ultimele intervin P-selectinele (PADG-EM sau proteina de membrană de 140 kD denumită p 140) exprimate pe trombocite şi megakariocite, pe celulele endoteliale inflamate. Sunt, ca şi E-selectinele, receptori pentru granulocitele PMN şi macrofage, dar nu pentru limfocite, legându-se la oligozaharidele de pe membrana acestora, oligozaharide care conţin cantităţi mari de acid sialic.

Pentru a putea media legăturile intercelulare, toate cele trei selectine solicită prezenţa $Ca^{2+}$.

Desigur că aceste "momente" în aderarea intercelulară sunt incomplete, *in vivo* probabil că fenomenele sunt mult mai ample şi mai complexe. În orice caz, studiul moleculelor de adeziune ar putea aduce noi informaţii teoretice şi practice de o valoare încă greu de evaluat în momentul de faţă.

## RECEPTORII DE MEMBRANĂ

Receptorii de membrană sunt complexe moleculare cu ajutorul cărora celula recunoaşte specific sau nespecific diferiţi "liganzi". În ultimă instanţă, relaţia ligand-receptor este un proces informaţional care stă la baza activării sau inhibării unor funcţii celulare. Majoritatea receptorilor sunt situaţi la nivelul membranei, de unde şi denumirea lor de "receptori de membrană", recunoscând diferite antigene, lectine, enzime etc. Unii receptori, în special cei pentru hormoni, sunt situaţi în interiorul celulei, fie la nivelul citoplasmei, fie la nivelul nucleului (tabelul 78). În multe cazuri receptorii sunt şi markeri pentru celulele respective. De exemplu, receptorii pentru antigen de pe suprafaţa limfocitelor *B* sunt şi markeri pentru aceste celule, deoarece sunt singurele celule din organism care au molecule de imunoglobuline "implantate" în membrana plasmatică. În cazul limfocitelor *T*, receptorul pentru eritrocitele de oaie (receptorul E) este şi marker pentru ele. Există o categorie specială de receptori, exprimaţi pe precursorii celulelor limfoide şi pe limfocitele imunocompetente, care orientează aceste celule spre organele limfoide primare, în cazul precursorilor, sau spre ariile *T* sau *B* dependente din organele limfoide secundare, în cazul celulelor competente imunologic.

*Tabelul 78*

**Diferite poziţii la nivel celular unde se pot localiza receptorii pentru hormoni (după A.O. Janne şi K. Kontula)**

| Localizare la nivelul | Receptori pentru hormonii |
|---|---|
| Membranei plasmatice | Oestrogeni, insulină, histamină, hormoni de creştere, ACTH, prostaglandine, catecolamine, glucagon, neurotransmiţători |
| Citoplasmei | Steroizi, vitamina D |
| Nucleului | Hormoni tiroidieni, steroizi |

Sunt "receptorii pentru acasă" sau "homing" şi sunt foarte puţin cunoscuţi, atât din punct de vedere al structurii biochimice cât şi funcţional. În orice caz, ei ajută celula să găsească drumul spre locul unde se va matura sau unde-şi va desfăşura activitatea. Fixarea ligandului la suprafaţa celulei, fie prin aderare neimună, fie prin recunoaşterea specifică de către receptor, este un act biologic comun tuturor celulelor sistemului limfoid, dar soarta ligandului depinde de tipul de celulă care l-a fixat. În cazul macrofagelor, de exemplu, ligandul este fagocitat, internalizarea fiind mai rapidă atunci când el a fost fixat la nivelul receptorilor *Fc* prin intermediul anticorpilor şi mai lentă atunci când a fost ataşat la membrana plasmatică prin molecule de adeziune. În cazul celulelor dendritice din splină sau ganglioni limfatici, ligandul este menţinut la suprafaţa celulei într-o formă accesibilă limfocitelor, fără a mai fi internalizat.

În linii generale, recunoaşterea ligandului de către receptor poate avea consecinţe diferite, dintre care cele mai importante ar fi următoarele:

a) menţinerea un oarecare timp a ligandului ataşat la suprafaţa celulei;

b) legarea încrucişată a receptorilor, în special a celor de natură imunoglobulinică de pe suprafaţa limfocitelor *B*, urmată de transmiterea de semnale activatoare în interiorul celulei;

c) mobilizarea complexelor ligand-receptor şi aglomerarea lor sub formă de "pete" dispersate uniform pe suprafaţa celulei, sau sub formă de "glugă", de aspectul unei "căciuli" la un pol al celulei;

d) desprinderea celor care nu sunt internalizaţi prin "raderea" lor şi pătrunderea în circulaţie sub formă de molecule libere sau de complexe antigen-anticorp;

e) endocitoza complexelor, urmată de degradarea şi "prelucrarea" intracelulară a lor (aceste procese au loc la nivelul macrofagelor);

f) exocitoza materialului prelucrat (în special în cazul celulelor "prezentatoare de antigen").

Raderea şi eliminarea receptorilor este un proces care interesează numai moleculele de la suprafaţă, de la nivelul membranei plasmatice, ca de pildă antigene de histocompatibilitate, moleculele de imunoglobulină cu funcţie de receptori pentru antigen de pe limfocitele *B*, diferite fosfolipide, glicoproteine etc. Procesul este continuu, selectiv, nu afectează viabilitatea celulelor, contribuind la modularea permanentă a membranei ei.

Desprinderea, evidenţiabilă prin tehnici de iodurare a proteinelor folosind drept catalizator peroxidaza, se realizează probabil proteolitic şi interesează în special domeniile de tip II ale membranei celulare ale căror componente se dovedesc a fi unităţi funcţionale cu rol în recunoaşterea structurilor străine de celulă. Internalizarea componentelor non-proprii este atributul major al celulelor cu funcţii fagocitare, deşi acest proces biologic poate fi întâlnit şi la celulele nefagocitare, în care pot pătrunde prin difuziune enzime sau hormoni, care vor fi recunoscuţi şi fixaţi de către receptorii de la nivelul citoplasmei sau membranei.

Schematic, internalizarea sau endocitoza se realizează în următoarele secvenţe:

a) recunoaşterea ligandului şi fixarea lui la receptor;

b) mobilizarea complexelor ligand-receptor;

c) internalizarea lor (endozomi, fagozomi);

d) desfacerea în interiorul fagozomilor a complexelor şi denaturarea ligandului, cu sau fără păstrarea determinanţilor antigenici.

## RECEPTORII DE ORIENTARE A LIMFOCITELOR (CĂTRE "CASĂ" SAU "ECOTAXIE" SAU "HOMING")

Precursorii celulari care descind din celula matcă migrează spre timus sau rămân cantonaţi în măduva osoasă, unde sunt "şcolarizaţi" pentru a deveni celule efectoare *T*, respectiv *B*. Odată maturate, limfocitele pătrund în circulaţia periferică şi în organele limfoide secundare, unde cantonează în "arii" bine delimitate, specifice celulelor *T* sau *B*. Această migrare diferenţiată este posibilă datorită existenţei, la nivelul membranei precursorilor sau celulelor competente imunologic, a unor receptori care recunosc liganzii de la nivelul ariilor respective deci care-şi recunosc "domiciliul", de unde şi denumirea lor de receptori pentru "homing". În fond, sunt molecule de suprafaţă cu funcţie de receptori care recunosc determinanţi specifici de pe membrana celulelor endoteliale care căptuşesc venulele organelor respective (ganglioni, splină, timus etc.), orientând selectiv subpopulaţiile celulare spre ariile lor specifice, de unde concluzia că interacţia limfocit-endoteliul venulelor este organ-specifică.

De dată foarte recentă, au putut fi identificaţi unii dintre aceşti receptori, deşi în acest domeniu încă există foarte multe necunoscute şi incertitudini. Astfel, la nivelul limfocitelor competente din circulaţia sangvină, ar exista o proteină receptor (la şoarece este recunoscută de către anticorpii monoclonali Mel-14) care ar recunoaşte reziduul "fosfomanosil" după unii, sau "glucozaminoglicanol" de la nivelul plăcilor Peyer, ganglionilor, endoteliilor etc. Această proteină cu funcţie de receptor pentru homing este antigenul CDw44 de pe suprafaţa limfocitelor şi celulelor neuronale cu greutate moleculară 85-95 kD şi cu o secvenţă a ultimelor 90 de reziduuri dinspre extremitatea $NH_2$ terminală omoloagă cu secvenţa proteoglicanilor din domeniile globulare ale cartilajelor (fig. 108). CDw44 pare analog altor proteoglicani transmembranari care pot lega structuri extracelulare la citoschelet. Acest receptor, prezent atât pe limfocite cât şi pe alte tipuri de celule care exprimă CDw44, ar recunoaşte, dependent de $Ca^{2+}$ polizaharizii bogaţi în glucozofosfat sau manozo-6-fosfat de la nivelul venulelor endoteliale din ariile limfoide ale ganglionilor limfatici periferici, deşi nu este exclus ca ligandul pentru acest receptor să fie şi un hidrat de carbon anionic, cu atât mai mult cu cât proteinele receptorului pentru "homing" par a fi înzestrate cu situsurile de legare pentru hidraţii de carbon. În orice caz, există speranţa că în viitorul apropiat cunoştinţele referitoare la natura acestor receptori vor fi mult mai exacte, deşi problema în sine nu este atât de uşor de rezolvat, deoarece receptorii pentru "homing" la hemocitoblaşti în special, care se pare că sunt primii exprimaţi la nivelul membranei, ar putea avea o existenţă efemeră, supusă modulării antigenice ireversibile.

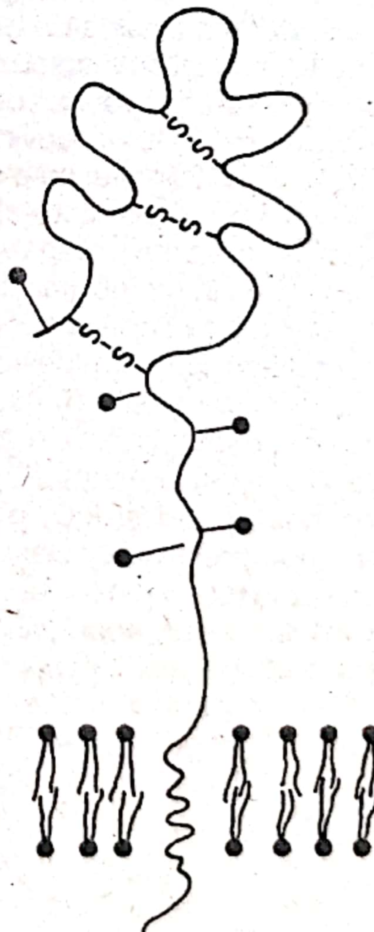



Fig.108. Receptorul pentru "ecotaxie" este un lanţ polipeptidic cu trei duble legături disulfidice intralanţ şi cu diferite locuri de fixare a oligozaharidelor (după D.R. Coombe şi col.)

Natura imunoglobulinică a acestor receptori este bine precizată. Astfel, dacă un epitop este legat la particule solide introduse într-o coloană de sticlă şi dacă prin această coloană se trece o populaţie de limfocite, limfocitele B care au receptori pentru epitopul fixat vor fi reţinute pe coloană (cromatografie de afinitate). Receptorii de pe membrana celulelor au legat antigenul care, fiind la rândul lui fixat la particule, a reţinut celulele. Dacă însă, înainte de trecerea celulelor prin coloană, sunt trecute molecule de imunoglobulină cu funcţie de anticorpi anti-epitopul respectiv, celulele nu vor mai fi reţinute, deoarece anticorpii liberi au blocat epitopii. Acelaşi efect se obţine şi prin tratarea limfocitelor cu ser anti-imunoglobulină; anticorpii anti-imunoglobulină se fixează pe receptorii de natură imunoglobulinică ai limfocitelor *B* blocând funcţiile lor. Prin astfel de metode se poate verifica nu numai existenţa receptorilor de natură imunoglobulinică de pe suprafaţa limfocitelor, dar şi validitatea teoriei "selecţiei clonale", respectiv existenţa clonelor de celule cu receptor unic pentru antigen. De exemplu, printr-o coloană, în care se găseşte fixat la particule solide un anumit determinant antigenic, se trece o populaţie de limfocite, după care celulele eluate (nereţinute pe coloană) sunt inoculate la şoareci iradiaţi letal. Animalele astfel reconstituite pot răspunde prin sinteză de anticorpi atunci când sunt stimulate antigenic faţă de toţi determinanţii antigenici existenţi în natură, cu excepţia celui care a fost fixat pe coloana cromatografică, deoarece acesta a reţinut clona de celule *B* cu receptori pentru el. Cu alte cuvinte, animalele iradiate letal şi reconstituite au primit toate clonele de limfocite, cu excepţia clonei reţinute pe coloană.

Un limfocit B are pe suprafaţa sa cca. $10^5$ receptori cu specificitate pentru un singur epitop, pe care celula este predestinată să-l recunoască. Aceşti receptori sunt încorporaţi în membrana celulară, având expus la suprafaţă fragmentul *Fab* al moleculei (de la capătul $NH_2$ terminal al lanţurilor grele şi domeniile $C_H3$ sau $C_H4$. Sunt dispuşi uniform pe suprafaţa celulelor murine şi sub formă de "pete" pe limfocitele umane şi suferă mişcări de redistribuire (capping), independent de mişcările de redistribuire ale altor structuri existente pe suprafaţa membranei celulare (fig. 109). Receptorii pentru antigen de pe majoritatea limfocitelor *B* aparţin claselor IgM şi IgD, o proporţie mică de celule (cca. 2-5%) având şi receptori aparţinând altor clase de imunoglobuline. Într-un stadiu de dezvoltare precoce, precursorii limfocitelor *B* sunt lipsiţi de receptori de membrană. Pe măsura maturării lor, apar întâi intracitoplasmatic lanţurile $\mu$, apoi receptorii IgM, antigenele DR (sau Ia la şoarece) ale MHC şi, în sfârşit, receptorii IgD (fig. 110).

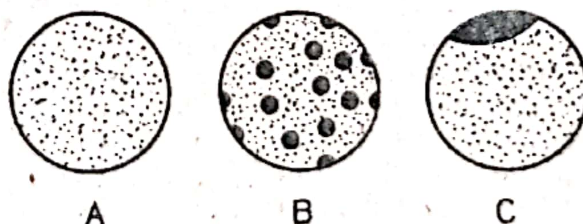



Fig.109. Receptorii de pe suprafaţa limfocitelor pot fi dispersaţi uniform pe membrana plasmatică (A) sau sub formă de "pete" (B). Când fixează ligandul, se adună la un pol al membranei sub formă de "glugă" (C), după care sunt internalizaţi.

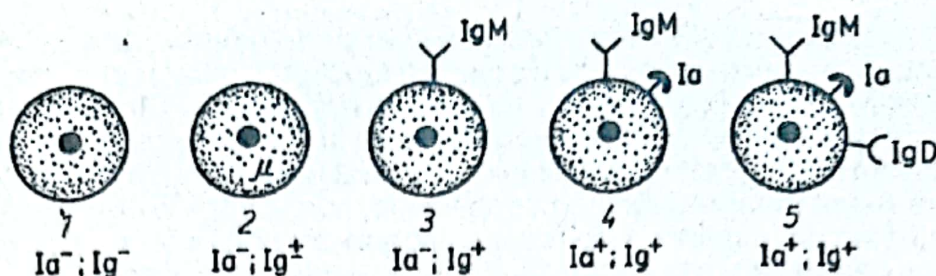



Fig.110. Exprimarea antigenelor complexului major de histocompatibilitate (Ia) şi a receptorilor de natură imunoglobulinică pe membrana limfocitelor B de şoarece. În stadiile timpurii de dezvoltare (1) celulele nu exprimă antigene Ia şi receptori, fiind $Ia^-$, $IgM^-$ şi $IgD^-$. Ulterior, în diferite stadii de maturare, apar intracitoplasmatic lanţurile $\mu$ (2), receptorii IgM (3), antigenele Ia (4) şi apoi receptorii IgD (5), celula devenind imunocompetentă ($Ia^+$, $IgM^+$, $IgD^+$).

Nu se cunoaşte precis de ce pe aceeaşi celulă coexistă receptori IgM şi IgD. S-a susţinut că celulele IgD ar răspunde normal la stimuli cu antigene timo-dependente, dar nu şi la stimuli cu antigene timo-independente. Rezultatele experimentale sunt însă contradictorii. Se pare că şi limfocitele $IgD^-$ pot reacţiona la antigene timoindependente, dar necesită unele semnale de la limfocitele *T* pe care celulele $IgD^+$ nu le solicită.

În momentul în care antigenul a fost recunoscut şi fixat de către receptorii imunoglobulinici, la nivel celular se declanşează o serie de evenimente care se succed în următoarea ordine: legarea încrucişată a receptorilor imunoglobulinici pe suprafaţa celulei, modificări în arhitectura citoscheletului, producerea sau activarea unor mesageri intracelulari şi, în sfârşit, exprimarea de noi receptori pe membrană. Dar natura receptorilor de membrană ar putea influenţa unele funcţii ale celulei şi lăsa indiferente altele. Din acest punct de vedere, este posibil ca legarea antigenului la receptorul IgD să declanşeze activarea celulei, iar legarea la receptorii IgM să conducă spre declanşarea unor mecanisme de control şi autoreglare. Receptorii IgM se găsesc numai sub formă de monomeri, nu şi de pentameri. Legarea antigenului la aceşti receptori ar declanşa atât funcţiile ei secretoare cât şi unele procese de control, de genul toleranţei. Dar şi această posibilitate este speculativă, deoarece existenţa unor populaţii celulare cu caracter leucemic (cum ar fi linia de celule Daudi cu receptori IgM pentru antigen, rezultată din proliferarea neoplazică a limfocitelor *B* aflate în acest stadiu de diferenţiere) sugerează că receptorii IgM, chiar dacă au vreun rol, nu pot controla eficient funcţiile proliferative ale celulei.

În afară de receptorii pentru antigen din clasa IgM şi IgD, sunt şi limfocite cu receptori imunoglobulinici din clasa IgG, IgA sau IgE. De la un bolnav cu boala Hodgkin a fost obţinută şi se menţine *in vitro*, ca linie stabilizată, linia limfoidă S59 în care celulele au receptori de membrană din clasa IgG. La persoanele cu infecţii parazitare, populaţia celulară cu receptori IgE este mai bogată, iar exprimarea acestora pe membrana celulei mai puternică.

## RECEPTORII PENTRU ANTIGEN PE MEMBRANA PLASMATICĂ A LIMFOCITELOR *T*

Deoarece pe membrana celulelor *T* se găsesc ataşate molecule de imunoglobulină, a fost acreditată ideea că şi la această clasă de limfocite receptorii pentru antigen sunt tot de natură imunoglobulinică. Dar, unele fapte experimentale contraveneau flagrant acestui concept. Astfel, limfocitele *T* nu pot fi

reţinute prin cromatografie de afinitate aşa cum sunt reţinute celulele *B*. Mai mult, anticorpii anti-imunoglobulinici nu blochează funcţional receptorii pentru antigen de pe *T*, fapt care infirmă natura imunoglobulinică a lor. Studii ulterioare au demonstrat fără echivoc că imunoglobulinele de la nivelul membranei limfocitelor *T* sunt ataşate citofil şi nu implantate în dublul strat lipidic al membranei. Dar, dacă limfocitele *T* sunt tratate cu anticorpi anti-idiotip, adică anti – $V_H$ şi – $V_L$, aceştia se leagă de receptori în maniera de reacţie antigen-anticorp, de unde concluzia că receptorul pentru antigen al celulei *T* are un situs combinativ cu o structură idiotipică identică regiunii variabile a receptorului pentru antigen de pe limfocitul *B*. Deci, receptorul pentru un anumit determinant antigenic are aceeaşi specificitate de recunoaştere atât pe limfocitele *T* cât şi pe cele *B*. Într-adevăr, între receptorii pentru antigene ale celor două clase de limfocite există multe asemănări. Şi unii şi alţii sunt monomeri alcătuiţi din două lanţuri (*H* şi *L* în cazul limfocitelor *B*, $\alpha$ şi $\beta$ sau $\gamma$ şi $\delta$ în cazul celor *T*), care la extremitatea $NH_2$ terminală formează situsuri combinative identice atunci când au specificitate pentru acelaşi epitop, indiferent de similitudinea dintre domeniile *V* ale receptorilor pentru antigene de pe limfocitele *T* şi *B*: au aceeaşi mărime, formă, complementaritate pentru antigen etc. De asemenea, lanţurile au extremităţi COOH terminale cu o secvenţă constantă a amino-acizilor, la extremitatea căreia se află un segment transmembranar prin care sunt ancorate la membrană. Dar, pe lângă aceste asemănări există şi multe deosebiri, regulile de recunoaştere a antigenelor de către limfocitele *T* şi *B* fiind total diferite. Astfel, receptorul pentru antigen de pe limfocitele *T* are, ca şi cel de pe limfocitele *B*, determinanţi idiotipici asociaţi regiunii variabile a lanţurilor, dar nu are determinanţi izotipici de genul celor prezenţi la nivelul fragmentului *Fc* al lanţurilor grele ( *H* ). Segmentul transmembranar COOH terminal, în cazul receptorului pentru antigen de pe limfocitul *T*, este prea scurt implantat în citoplasmă, în care pătrunde doar o porţiune mică din el, din care cauză nu poate transmite semnale în interiorul celulei. De aceea, pentru a deveni un situs activ, se asociază altor proteine la nivelul membranei sau citoplasmei care transmite sau vor contribui la transmiterea semnalelor.

Patru direcţii de abordare au permis elucidarea enigmelor referitoare la receptorii pentru antigen de la nivelul limfocitelor T, şi anume: a) obţinerea de clone de celule *T* cu receptori pentru diverşi epitopi care au putut fi cultivate şi menţinute *in vitro;* b) utilizarea anticorpilor monoclonali anti-diverse componente moleculare care intră în alcătuirea receptorului; c) clonarea genelor care controlează sinteza diferitelor regiuni ale lanţurilor polipeptidice care formează receptorul şi d) izolarea receptorului şi studierea sa din punct de vedere chimic.

Cu ajutorul acestor metodologii, s-a demonstrat că receptorul pentru antigen de pe membrana limfocitului *T* este format din heterodimeri reprezentaţi de lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ sau $\gamma$ şi $\delta$, cu regiuni constante şi regiuni variabile, asemănătoare regiunilor variabile ale imunoglobulinelor. Prin disocieri parţiale cu detergenţi (Triton X100, digitonină etc.), prin studiul variantelor apărute spontan la celulele *T* care conţin un singur lanţ $\alpha$ sau $\beta$ şi nu dimerul $\alpha\beta$, precum şi prin transplantarea de grupe de lanţuri la celulele non-*T*, deci la alte celule decât limfocitele *T*, şi asamblarea lor în maniere diferite, au fost obţinute diverse complexe moleculare şi au fost identificate toate lanţurile polipeptidice care intră în componenţa receptorului pentru antigen de pe celule *T*.

Acum se ştie precis că acest receptor este format din:

a) două lanţuri polipeptidice denumite heterodimeri $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ care recunosc specific determinantul antigenic şi care funcţional sunt similari receptorilor de natură imunoglobulinică ai celulelor *B*, denumiţi prescurtat TCR (T cell receptors);

b) moleculele constitutive care formează complexul CD3 cu lanţurile $\gamma\delta\varepsilon$ la care este asociat lanţul $\alpha$ şi eventual şi lanţul $\beta$. Acest complex contribuie la transmiterea informaţiei despre antigen în interiorul celulei (fig. 111);

c) monomerul $\alpha$ (CD4) sau dimerul $\alpha\beta$ (CD8), nişte lanţuri polipeptidice adiţionale care recunosc antigenele de clasa II, respectiv de clasa I MHC de pe membrana celulei prezentatoare de antigen (APC);

d) proteine auxiliare (CD2, LFA-1) care realizează legarea limfocitului T la celulele prezentatoare de antigen şi menţinerea lui în contact cu aceste celule pe toată durata obţinerii informaţiilor despre antigen.

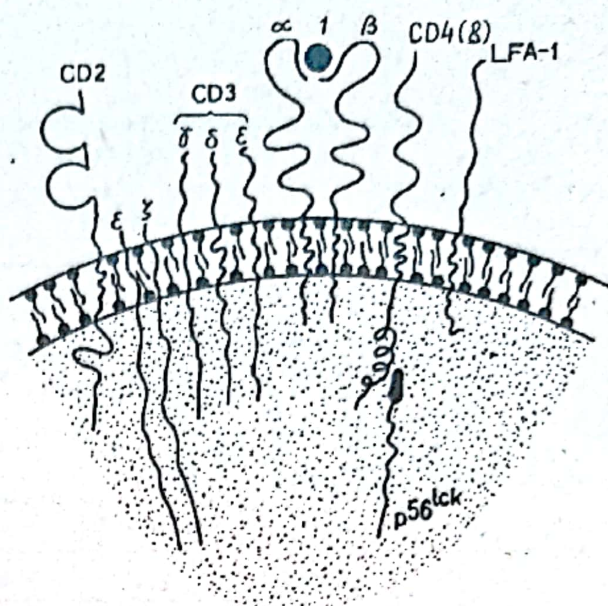



Fig.111. Receptorul pentru antigen al limfocitului T are o structură complexă. Este alcătuit din heterodimerul $\alpha\beta$ care recunoaşte specific antigenul (1), din complexul CD3 cu lanţurile $\gamma\delta\varepsilon$, din monomerul $\zeta\zeta$ sau heterodimerul $\zeta\eta$, precum şi din moleculele asociate sau accesorii (CD2, CD4, CD8, LFA-1) care asigură fuziunea cu celulele prezentatoare de antigen (APC).

Complexul TCR-CD3 conţine cca. 7 lanţuri polipeptidice din superfamilia imunoglobulinelor (cu extremitatea $NH_2$ terminală exprimată la nivelul celulei şi cu cea COOH terminală implantată în citoplasmă) alcătuite din domenii extracelulare, transmembranare şi intracelulare, cu lungimi şi greutăţi moleculare diferite (tabelele 79 şi 80).

*Receptorul pentru antigen $\alpha\beta$* este exprimat pe majoritatea limfocitelor *T* imunocompetente şi alcătuit din heterodimerul $\alpha\beta$ (TCR), lanţurile $\gamma\delta\varepsilon$ ale grupului CD3 şi lanţurile $\zeta$ sau $\eta$ (fig.112).

*Tabelul 79*

**Grupe de molecule care intră în componenţa receptorului pentru antigen sau au rol în transmiterea unor semnale către limfocitul T**

| Grupa de molecule | Lanţurile polipeptidice care le compun | Funcţii principale |
|---|---|---|
| Moleculele care recunosc specific antigenul (TCR) | Heterodimerii $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ | Recunosc specific epitopii, sub restricţie MHC |
| Molecule de recunoaştere a MHC | Lanţurile $\alpha$ (CD4)<br>Lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ (CD8) | Recunosc antigenele MHC de la nivelul celulelor APC |
| Molecule de transmitere de semnale | $\gamma\delta\varepsilon$ (CD3) şi $\zeta\eta$ | Implicate în transmiterea către nucleu a semnalelor de recunoaştere primite de la TCR |
| Molecule de adeziune | CD2 | Leagă LFA-3 de celulele APC |
| | LFA-1 | Leagă ICAM-1 sau ICAM-2 de pe celulele ţintă |
| Alte molecule cu rol în transmiterea de semnale | Receptori pentru interleukine | Fixează IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 etc. |
| | CD 28 şi CTLA-4 | Leagă B7 de pe APC |
| | CD 5 | Leagă CD 72 de pe APC |

*Tabelul 80*

**Caractere structurale ale lanţurilor din complexul TCB - CD8**
**(după A. Ezquerra şi J.E. Coligan)**

| Complexul (lanţul) | | Greutatea moleculară (kD) | | Glicozilarea | | Legături disulfidice |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Om | Şoarece | Om | Şoarece | |
| Hetero-dimerul | $\alpha$ | 45 - 60 | 45 - 55 | + | + | Heterodimer |
| | $\beta$ | 40 - 45 | 40 - 55 | + | + | Heterodimer |
| | $\gamma$ | 40 - 55 | 35 - 42 | + | +/+ | Heterodimer |
| | $\delta$ | 40 - 60 | 44 - 62 | + | + | Heterodimer |
| CD3 | $\gamma$ | 25 - 28 | 21 | + | + | - |
| | $\delta$ | 20 | 28 | + | + | - |
| | $\varepsilon$ | 20 | 25 | - | ? | - |
| Lanţuri accesorii | $\zeta$ | 16 | 16 | - | - | x |
| | $\eta$ | ? | ? | ? | ? | x |

Notă. Deşi sunt notate la fel, totuşi lanţurile $\gamma\delta$ ale heterodimerului $\gamma\delta$ sunt distincte de cele din componenţa complexului CD3. x = Pot forma heterodimeri $\zeta\eta$ sau heterodimerul $\zeta\zeta$.

Determinantul antigenic este recunoscut de către situsul combinativ situat la extremitatea $NH_2$ terminală a lanţurilor $\alpha$ de 40-50 kD şi $\beta$ de 40-44 kD cu un mare potenţial de legare a unor oligozaharide, în special manoză, şi codificate de către gene diferite. Ca şi moleculele de imunoglobulină, fiecare lanţ are un segment extracelular cu o regiune variabilă *V* ($V\alpha$ sau $V\beta$) alcătuită din 102-109 reziduuri de aminoacizi, şi alta constantă *C* ($C\alpha$ sau $C\beta$) alcătuită din 87-113 reziduuri, un segment transmembranar (20-24 reziduuri de aminoacizi) şi unul intracitoplasmatic foarte scurt cu 5-12 aminoacizi. Lanţurile sunt legate între ele prin legături disulfidice (-S-S-), care fac legături şi în cadrul aceluiaşi lanţ, deci legături inter- şi intralanţ. Segmentul intracitoplasmatic, o adevărată "coadă" hidrofilică scurtă, se leagă necovalent la proteinele grupului CD3 auxiliar care preia informaţia despre antigen şi o transmite citoplasmei. Datorită unor reziduuri Cys de la nivelul segmentelor extracelulare, dublele legături disulfidice intralanţ formează câte o buclă la nivelul regiunii *V* şi la nivelul regiunii *C*. Se pare că regiunile $V\alpha$ şi $V\beta$ pot recunoaşte antigenul fie independent, fie asociate, situaţie în care o regiune $V\alpha$ a unui lanţ $\alpha$ care recunoaşte specific un epitop

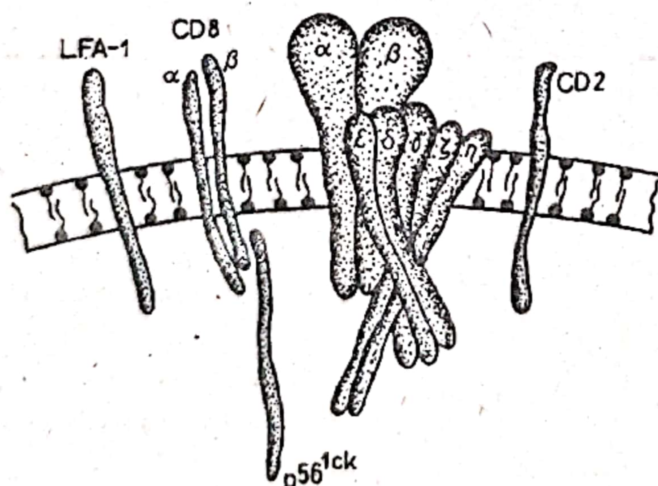



Fig.112. Reprezentarea stilizată a receptorului pentru antigen al limfocitului T. Heterodimerul $\alpha\beta$ este asociat cu lanţurile $\gamma\delta\varepsilon$ ale CD3 şi cu dimerul $\zeta\zeta$ sau $\zeta\eta$. Moleculele accesorii LFA-1 şi CD4 sau CD8 leagă antigenele MHC, ICAM etc.

unic se poate asocia cu diferite lanţuri $V\beta$ cu alte specificităţi, şi invers. În acest fel, se amplifică potenţialul de recunoaştere a receptorului pentru antigen (fig. 113).

Lanţurile polipeptidice ale grupului CD3 au o secvenţă a aminoacizilor omoloagă, în special cele $\gamma$ şi $\delta$, şi legături disulfidice intralanţ, care la lanţul $\varepsilon$ sunt mai numeroase.

Secvenţa reziduurilor de aminoacizi la nivelul domeniului intracitoplasmatic este identică la toate cele trei lanţuri, probabil şi datorită faptului că genele care le controlează sinteza sunt situate pe acelaşi cromozom (cromozomul 11).

Unii susţin că lanţul $\beta$ din dimerul $\alpha\beta$ ar fi legat covalent la lanţul $\gamma$, iar lanţul $\alpha$ la lanţul $\delta$ din grupul CD3.

La celulele *T* cu deficit de lanţ $\delta$ este un exces de lanţuri $\gamma$ care se pare că le înlocuiesc pe cele $\delta$ care lipsesc.

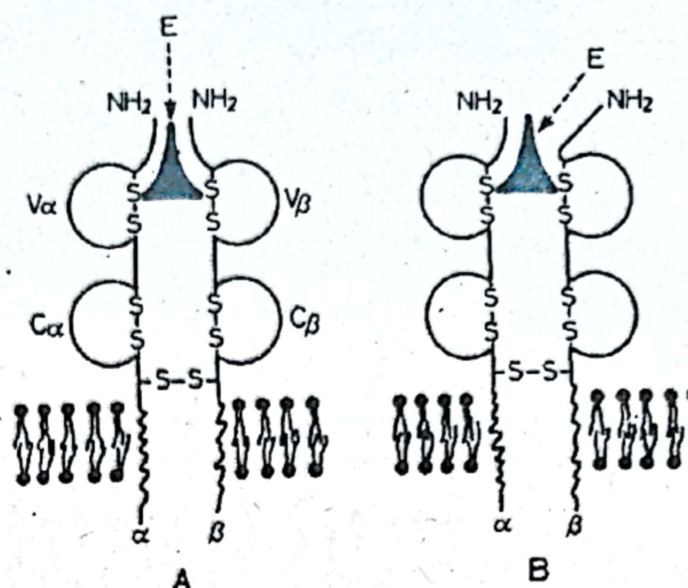



Fig.113. Model ipotetic de realizare a recunoaşterii epitopului de către lanţurile $\alpha\beta$ din componenţa receptorului pentru antigen.

A. Lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ au la nivelul extremităţii lor $NH_2$ terminale o conformaţie complementară epitopului E, ambele concurând la formarea situsului combinativ, într-o manieră înalt specifică.

B. Lanţul $\alpha$ are structura complementară epitopului E iar lanţul $\beta$ este mai puţin specific. În această situaţie, recunoaşterea este realizată predominant de $\alpha$, participarea lanţului $\beta$ fiind moderată. În schimb, lanţul $\beta$ poate recunoaşte specific epitopii înrudiţi, mărindu-se astfel spectrul funcţional al TCR.

Lanţul $\zeta$ cu cca. 143 reziduuri de aminoacizi este implantat adânc în citoplasmă. Are un segment extracelular foarte scurt, cu 9 reziduuri de aminoacizi, dintre care unul este Cys, un segment transmembranar de 20-21 de reziduuri de aminoacizi şi unul citoplasmatic cu 113 reziduuri. Majoritatea lanţurilor formează homodimeri $\zeta\zeta$, dar cca. 10 dintre ele pot forma şi heterodimeri în care asociază lanţul $\eta$ ($\zeta\eta$), un lanţ diferit de toate celelalte care intră în componenţa CD3 sau asociate acestuia. Heterodimerii se realizează prin legături disulfidice interlanţ. Pentru recunoaşterea determinantului antigenic şi transmiterea intracelulară a semnalelor, nu este suficientă numai participarea complexului TCR-CD3 cu cele 6 sau 7 lanţuri ale sale. Celulele prezentatoare de antigen (APC) îl prezintă pe acesta limfocitelor *T* numai în asociere cu moleculele de clasa I sau II a MHC; epitopul este recunoscut de către dimerul $\alpha\beta$ prin situsul combinativ de la extremităţile $NH_2$ terminale, iar moleculele MHC de către monomerul CD4 sau dimerul CD8, membri ai superfamiliei de imunoglobuline care vor lega antigenele MHC de clasa II, respectiv de clasa I. Astfel, în procesul de prezentare şi recunoaştere a antigenului de către limfocitul *T* se formează un complex cuaternar alcătuit din antigen + molecule MHC (clasa I sau II), dimer $\alpha\beta$ + lanţurile CD4 sau CD8 (vezi fig. 107 şi fig. 111).

Polipeptidul unic CD4 este un lanţ format din 433 reziduuri de aminoacizi, dintre care 370 formează domeniul extracelular, iar 37 pe cel intracitoplasmatic. În domeniul extracelular sunt 6 reziduuri Cys care realizează legături disulfidice

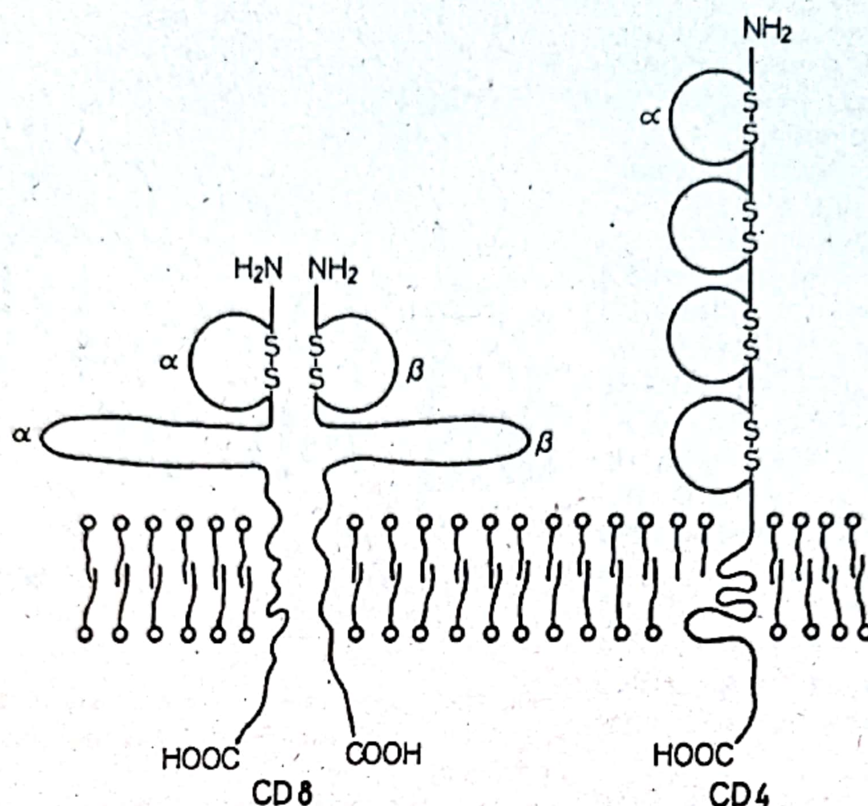



Fig.114. Heterodimerul CD8 ($\alpha\beta$) şi monomerul Cd4 ($\alpha$). Detalii în text.

intralanţ care vor contribui la formarea a trei bucle. Acest lanţ leagă glicoproteina 120 a virusului HIV.

Spre deosebire de monomerul CD4 care este exprimat pe limfocitele *T* ajutătoare şi recunoaşte moleculele de clasa II a MHC, CD8 este un dimer format din lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ (sau I şi II), fiind exprimat pe celulele *T* citotoxice sau *T* supresoare. Acest dimer recunoaşte moleculele din clasa I a MHC. Lanţurile CD8 sunt aproape de două ori mai scurte decât cele CD4, având doar 210 reziduuri de aminoacizi, dintre care 162 formează domeniul extracitoplasmatic şi numai 23 pe cel intracitoplasmatic. Au câte două reziduuri Cys care realizează legături disulfidice intralanţ şi formarea câte unei bucle. De la nivelul reziduului 120 spre reziduul 150, atât lanţul $\alpha$ cât şi cel $\beta$ sunt pliate, fără a avea legături disulfidice, astfel că ele par mai scurte decât sunt în realitate (fig. 114). În urma contactului cu moleculele din clasa I MHC, aceste curburi se îndreaptă, lanţurile alungindu-se. Atât CD4 cât şi CD8 au domeniile intracitoplasmatice foarte scurte, formate din 23-37 de reziduuri de aminoacizi. Pentru a declanşa semnalele necesare proliferării şi diferenţierii celulare, extremitatea COOH terminală a domeniului lor citoplasmatic se leagă printr-o secvenţă specifică la un segment din apropierea extremităţii $NH_2$ terminale a unei protein-tirozin-kinaze ($p56^{lck}$).

Protein-kinazele alcătuiesc o populaţie moleculară numeroasă, dintre care unele sunt receptori kinazici iar altele nu sunt receptori dar contribuie la transmiterea semnalelor venite de la alţi receptori de membrană. Din această a doua grupă, majoritatea aparţin familiei *src* de tirozin-kinaze. Sunt cel puţin 8 membri ai acestei familii, foarte asemănători între ei din punct de vedere structural şi, în parte, responsabili de ancorarea proteinelor la membrana plasmatică. Toţi conţin glicină, au domeniile $SH_1$, $SH_2$ şi $SH_3$ şi au capacitatea de a fi reglaţi funcţional prin fosforilarea unui reziduu de tirozină de la extremitatea COOH terminală.

Unii membri ai familiei *src* sunt exprimaţi restrictiv pe anumite celule sau ţesuturi. De pildă, *lck* pe limfocitele *T*, *fgr* pe monocite etc., iar alţii, ca *src, fyn* sau *yes*, pe fibroblaste şi alte celule.

Legătura dintre CD4 sau CD8 şi *p56*$^{lck}$ este mediată de cys, dar deleţia cozii citoplasmatice a CD3CD8 abrogă abilitatea de legare a p56$^{lck}$ şi activarea celulei de către antigen. Acest fapt dovedeşte că ambele lanţuri polipeptidice - CD4 sau CD8 şi p56$^{lck}$ - au rol activ în procesul de conexiune.

Proteina p56$^{lck}$ are 507 reziduuri de aminoacizi, un domeniu $NH_2$ terminal cu o regiune de legare a CD4 sau CD8, cu două domenii adiacente a SH2 şi SH3, un domeniu "kinază" şi o regiune terminală scurtă (fig. 115). Ea este un substrat

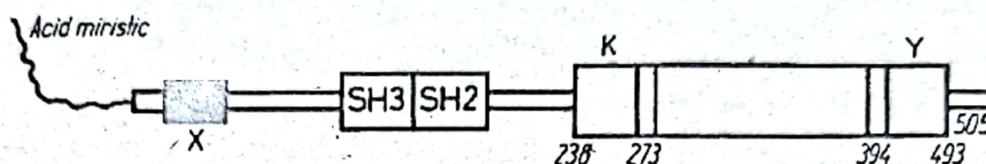



Fig.115. Structura moleculei de proteină p56$^{lck}$. Cifrele semnifică poziţia aminoacizilor în lanţ. x = regiunea de legare a lanţurilor CD4 sau CD8 (după. C. E. Ruod).

pentru CD45, o glicoproteină transmembranară implicată în transducerea semnalelor, a cărei porţiune intracelulară conţine reziduuri de serină fosforilată şi activitatea de tirozinfosfatază prin care se va activa tirozin-kinaza p56$^{lck}$. Prin coaglomerarea CD45 cu CD4 sau CD8, se ajunge la defosforilarea p56$^{lck}$ şi inhibiţia activităţii kinazice a acesteia.

Terminalul glycină este conjugat la grupul "acid miristic" implicat în legarea p56$^{lck}$. Regiunea de legare a acestei proteine se fixează la un segment de pe domeniul citoplasmatic al CD4 cu secvenţa KKTCQCPHRFQKT, sau al CD8 cu secvenţa RRVCKCPRPVVKS. Secvenţele de legare sunt codificate de către 13 reziduuri de aminoacid localizate la CD4 în mijlocul domeniului citoplasmatic (reziduurile 419 - 431), iar la lanţul $\alpha$ al CD8 aproape de suprafaţa internă a dublului strat lipidic, la nivelul reziduurilor 191-203.

Recunoaşterea ligandului, adică a moleculelor MHC de către CD4 sau CD8, activează p 56$^{lck}$ şi realizează o posibilă interacţie a CD4/CD8 - p56$^{lck}$ cu alte peptide, rezultând activări enzimatice şi fosforilări ale PI (fosfatidil-inozitol), PLC-$\gamma$ (fosfolipaza C-$\gamma$) precum şi a lanţului $\alpha$ din cadrul complexului TCR-CD3. Se pare aşadar că p56$^{lck}$ asigură nu numai transmiterea semnalelor activatoare în interiorul celulei, dar şi conexiuni funcţionale între complexele CD4/CD8p56$^{lck}$ şi TCR-CD3.

*Moleculele accesorii* nu fac parte integrantă din receptorul pentru antigen al limfocitului *T*, fiind doar asociate acestuia. Cele mai cunoscute sunt CD2, LFA-1 şi CD44 care recunosc liganzii LFA-3, ICAM-1 sau ICAM-2 şi acidul hialuronic de pe suprafaţa celulelor antigen prezentatoare. Aceste molecule sunt implicate în aderarea limfocitului *T* la celulele prezentatoare de antigen, contactul asigurat fiind critic pentru facilitarea recunoaşterii specifice a antigenului. Totodată, ele sunt candidaţi potenţiali la transmiterea semnalului II care, împreună cu semnalul I transmis de complexul TCR-CD3, activează funcţiile specifice ale celulei *T*.

– *Monomerul CD2* este receptorul E prin intermediul căruia limfocitele *T* leagă hematiile de oaie formând "rozete". Acest monomer este o glicoproteină de 50 kD cu un domeniu intracitoplasmatic lung, de 126 de reziduuri de aminoacizi care ar funcţiona probabil ca transductor de semnale (fig. 116). Este unul dintre cele mai timpurii antigene de diferenţiere intratimică a celulei *T*, care în primele stadii evolutive este $CD1^-CD2^+CD3^-$ $CD4^-$ $CD8^-$. Monomerul CD2, care recunoaşte ligandul natural LFA-3, larg răspândit pe diferite celule, are epitopul $T_{111}$, responsabil de formarea rozetelor E, deci cu rol de receptor pentru liganzi de pe

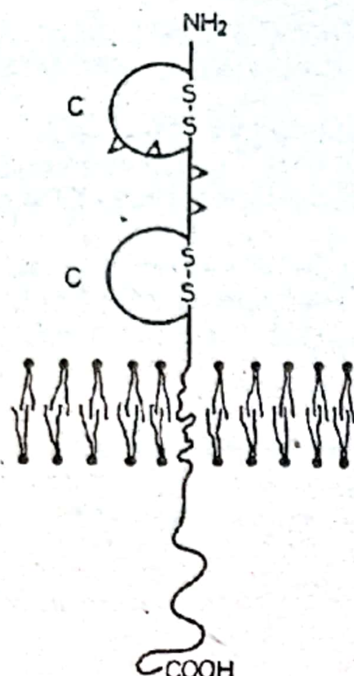



Fig.116. Receptorul E (CD2) este un monomer cu patru reziduuri Cys care formează două bucle constante (C) la nivelul domeniului extracelular. Domeniul intracelular este lung. Triunghiurile negre marchează locurile de inserţie a hidraţilor de carbon.

suprafaţa eritrocitelor de oaie şi epitopii T112 şi T113, ultimul fiind probabil exprimat numai pe celulele *T* activate. Se pare că CD2 ar fi implicat în activarea timpurie a limfocitelor *T* tinere, un fel de "cale alternativă" de activare care ar avea loc înaintea exprimării CD3-TCR pe suprafaţa membranei plasmatice. Într-adevăr, tratarea celulelor *T* cu anticorpi anti – T112 şi anti-T113 duce la activarea şi proliferarea lor.

Legarea LFA-3 la CD2 declanşează unele evenimente biochimice timpurii care pot preceda celor declanşate de complexul "clasic" TCR-CD3+Antigen+MHC şi care în linii mari constau din hidroliza PIP2 (fosfatidil-inozitol-difosfat), translocarea PKC (protein-kinaza C) de la nivelul citosolului spre membrană şi creşterea concentraţiei intracelulare a $Ca^{2+}$. Nu este exclus ca molecula responsabilă de inducerea semnalelor CD2 să fie lanţul $\zeta$. Lanţul polipeptidic CD2 este exprimat pe toate celulele mature, fiind invariabil legat la complexul molecular TCR-CD3 şi intervenind probabil în mecanismele de reglare a acestui complex.

– *LFA-1*, membră a familiei de integrine $\beta 2$, leagă ICAM-1 sau ICAM-2 iar CD44, o moleculă cu funcţii puţin cunoscute, leagă acidul hialuronic. Figura 117 redă schematic structura receptorului pentru antigen cu heterodimerul $\alpha\beta$ şi a moleculelor asociate lui.

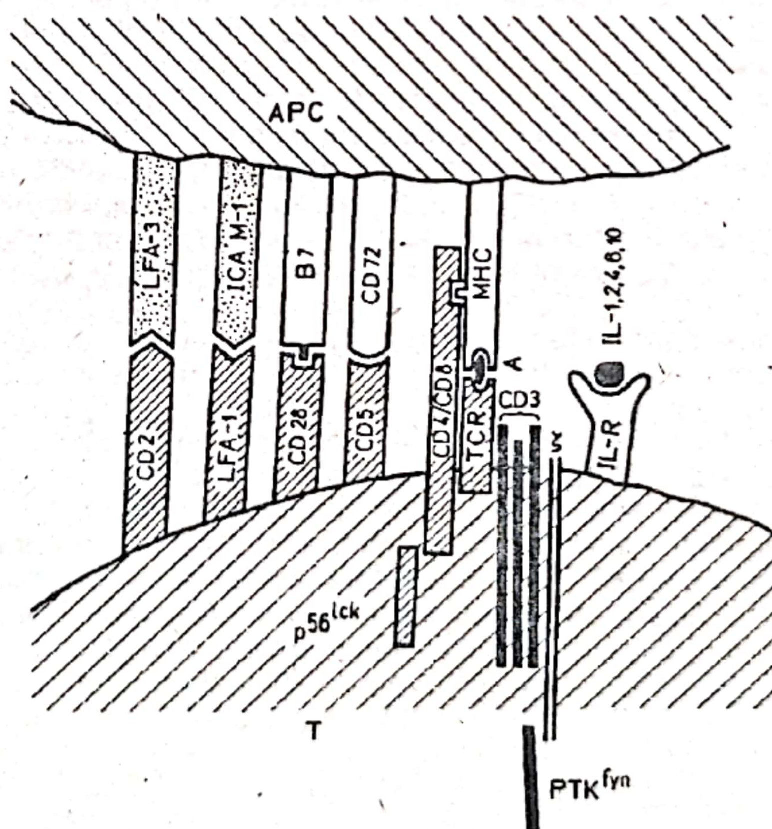



Fig.117. Receptorul pentru antigen pe suprafaţa limfocitelor T.

*Receptorul pentru antigen de tip* $\gamma\delta$(TCR$\gamma\delta$) sau receptorul TCR-1, spre deosebire de TCR $\alpha\beta$ sau TCR-2, este încă insuficient cunoscut. După descoperirea în 1983 a TCR $\alpha\beta$ în 1985 a fost izolată o genă distinctă care iniţial era considerată ca fiind responsabilă de codificarea unei subunităţi distincte $\alpha$ a TCR $\alpha\beta$. Dar când s-a izolat adevărata genă, $\alpha$, s-a constatat că subunitatea considerată a fi $\alpha$ era de fapt "altceva", o a treia genă, denumită $\gamma$. Lanţul $\gamma$ a fost identificat de precursorii limfocitari din timus în cursul stadiilor foarte timpurii de dezvoltare a limfocitelor *T*, considerându-se că nu au decât o importanţă tranzitorie în dezvoltarea ontogenică a acestei case de limfocite. Dar, în 1986, s-a demonstrat că proteina codificată de gena $\gamma$ se găseşte exprimată pe un subset distinct de celule *T* şi că face parte integrantă dintr-un heterodimer care este un alt TCR decât TCR $\alpha\beta$, denumit TCR $\gamma\delta$.

Acest receptor apare primul în cursul evoluţiei filogenetice şi ontogenetice, fiind o moleculă conservată evoluţionar, care ar media supravegherea imunologică a epiteliilor, contribuind la menţinerea integrităţii straturilor care separă organismul de mediul extern. Nu recirculă în epitelii şi se pare că nu difuzează prin aceste straturi. Timusul uman este colonizat de precursorii *T* la 7-8 săptămâni de sarcină, când se diferenţiază timocitele $CD2^-$, $CD3^-$, $CD4^-$, $CD8^-$, din care vor deriva limfocitele T$\gamma\delta$, procesul fiind dependent de IL-4. Celulele mature cu receptorii TCR$\gamma\delta$ sunt $CD2^+$ şi $CD3^+$, dar majoritatea lor sunt $CD4^-$ şi $CD8^-$. Ele apar timpuriu în timus, la naştere fiind o minoritate în acest organ. Majoritatea lor ar fi selectată la nivelul epiteliului intestinal, al pielii etc., şi nu la nivelul timusului aşa cum este cazul celor TCR$\alpha\beta$. Aici, în prezenţa moleculelor MHC de clasa II şi probabil şi a antigenului, ar fi selectate şi stimulate pentru a deveni limfocite *T* imunocompetente. Se pare că, în acest proces, moleculele MHC de clasa I nu au nici un rol, acesta revenind celor de clasa II. De exemplu, la şoarecii lipsiţi de molecule MHC clasa I prin distrugerea genei care controlează sinteza $\beta$2-microglobulinei, limfocitele *T* rămân normale din punct de vedere reacţional, fapt care demonstrează că selecţia acestora se face în afara epiteliului timic şi a moleculelor MHC de clasa I. Ea s-ar face extratimic, la nivelul celulelor epiteliale ale suprafeţelor corpului şi în prezenţa moleculelor MHC de clasa II şi probabil şi a antigenului. Problema este însă discutabilă, deoarece se pare că exprimarea receptorului $\gamma\delta$ pe suprafaţa celulelor *T* are loc foarte timpuriu în timus, selectarea şi activarea celulelor TCR$\gamma\delta$ fiind un proces mai tardiv, care are loc ulterior, după ce celulele au ajuns în periferie. Într-adevăr, limfocitele *T* cu receptorii $\gamma\delta$ reactive la "proteinele de şoc termic" (HSP) sunt prezente în timusul şoarecilor încă de la naştere. La om, ele sunt prezente mult mai timpuriu, la 7-8 săptămâni de viaţă embrionară, ca populaţie imatură $CD2^-$, $CD3^-$, $CD4^-$, $CD8^-$. La om ar fi două subpopulaţii de limfocite TCR$\gamma\delta$: o subpopulaţie $V\delta1$ care exprimă lanţurile $V\delta1$ dintre care multe sunt asociate necovalent cu diferite $V\gamma$ $C\gamma2$ şi care predomină toată viaţa în timus (ar fi deci forme tinere), şi alta $V\delta2$ dintre care multe sunt legate prin legături disulfidice cu lanţurile $V\gamma9$ $C\gamma1$ care predomină în circulaţia periferică în prima săptămână de viaţă.

Spre deosebire de limfocitele *T* cu receptorii $\gamma\delta$, cele cu receptorii $\alpha\beta$ ar apăra interiorul organismului recirculând prin organele limfoide şi recunoscând numai antigenele străine asociate cu moleculele MHC proprii. Această delimitare nu este totuşi categorică, deoarece şi în organele limfoide există celule cu asemenea receptori. Este foarte adevărat că acestea sunt în proporţie mică, de numai 1-2%, totuşi există, fapt care demonstrează că ele nu sunt cantonate în exclusivitate la nivelul epiteliilor. Rolul lor este cunoscut, deşi se pare că au funcţii multiple, ca de pildă funcţii citotoxice care ar reprezenta funcţia lor majoră, cu şi fără restricţie

MHC. Pot leza celulele ţintă, ca de pildă hematiile de pasăre, celulele infectate bacterian sau tratate cu endotoxine bacteriene, celulele leucemice sau atipice generate *în vivo* etc. De asemenea, au rol protector în unele boli infecţioase cum ar fi rujeola şi altele.

Limfocitele *T* cu TCR$\gamma \delta$ sunt mai "modeste" în pretenţiile lor faţă de celulele prezentatoare de antigen în comparaţie cu cele cu TCR$\alpha \beta$ cu aceeaşi specificitate de recunoaştere. Se pare că ele ar recunoaşte alţi determinanţi MHC decât cei recunoscuţi de cele $\alpha \beta$, ca de pildă un heterodimer particular HLA-DQ şi, fapt extrem de important, recunosc proteinele de şoc termic (HSP) autologe şi în special secvenţele aminoacide ale acestora care au fost cel mai bine conservate în cursul evoluţiei filogenetice. Această reactivitate la HSP ar fi o funcţie de bază a lor, cu rol major în supravegherea imună a epiteliilor.

A fost dovedit faptul că unele limfocite $T\gamma \delta$ recunosc proteinele bacteriene derivate din mycobacterii, toxoidul tetanic, unii copolimeri sintetici, unele aloantigene etc. Celulele cu acest tip de receptori ar alcătui o "primă linie de apărare", care se formează şi se maturează funcţional mult mai rapid decât cele cu TCR$\alpha\beta$, conform unei programări genetice de dezvoltare particulară. Este de bănuit că această "accelerare" a maturării lor este strict necesară deoarece pielea, intestinul, pulmonul, sunt primele organe expuse agresiunii bacteriene, aşa că, armele de apărare trebuie să fie gata pregătite pentru a neutraliza această agresiune.

Heterodimerul $\gamma \delta$ este similar din punct de vedere structural celui $\alpha \beta$, în sensul că, şi la unul şi la celălalt, lanţurile polipeptidice au un domeniu extracelular lung, cu un segment variabil *V* şi unul constant *C*, un domeniu transmembranar şi unul foarte scurt citoplasmatic. Intralanţ, sunt câte două legături disulfidice, una la nivelul segmentului variabil *V* şi alta la nivelul segmentului constant *C*. În cazul TCR$\gamma \delta$ există însă trei diferenţe la nivelul domeniului constant, controlate de gena *C* a TCR care generează trei forme de proteine deosebite structural, exprimate pe diferite clone de celule *T* aparţinând aceluiaşi individ. Una dintre ele are legături disulfidice între lanţurile $\gamma$ şi $\delta$, iar celelalte două nu au asemenea legături deoarece nu au reziduuri Cys la nivelul extremităţii constante din proximitatea membranei plastice, dar au alte secvenţe aminoacide care le modifică lungimea şi forma (fig. 118).

În concluzie, se poate afirma că heterodimerii $\alpha \beta$ şi $\gamma \delta$, receptori pentru antigen pe limfocitele *T*, din punct de vedere structural sunt similari structurii moleculelor de imunoglobulină. Totuşi, se deosebesc de acestea în sensul că sunt formaţi din câte un singur lanţ de un anumit tip asociat altuia de alt tip (un lanţ $\alpha$ asociat altuia $\beta$), pe când moleculele de imunoglobuline sunt dimeri, cu câte două lanţuri *L* şi două *H*, sau chiar multimeri, astfel că molecula receptorului pentru antigen pe limfocitul *T* are un singur situs combinativ, în timp ce molecula de imunoglobulină are două sau mai multe situsuri combinative.

Lanţurile $\alpha \beta$ sau $\gamma \delta$ sunt asociate cu proteinele complexului CD3 şi cu alte molecule de adeziune care, în cazul receptorilor pentru antigen de natură imunoglobulinică de pe limfocitele *B*, lipsesc.

Receptorul $\gamma\delta$ poate exista fie ca un heterodimer legat prin legături disulfidice, deci ca moleculă de tip 1, fie ca o structură legată necovalent, deci ca moleculă de tip 2 sau 3, în funcţie de exprimarea celor două gene ale regiunii constante a lanţului $\gamma$.

Acest receptor este primul sistem de recunoaştere specifică care a rămas încă într-un stadiu iniţial de dezvoltare. Astfel, are o variabilitate restrânsă de recunoaştere, nu poate face discriminări perfecte între epitopii cu structuri apropiate etc. De asemenea, TCR $\gamma \delta$ sunt exprimaţi pe timocitele tinere şi recunosc

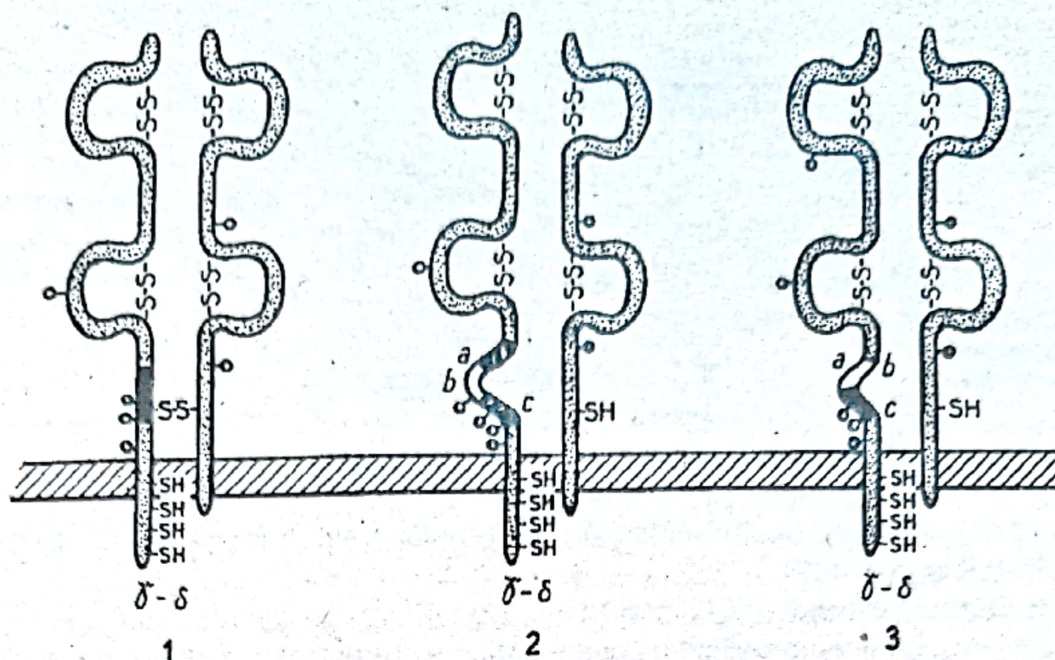



Fig.118. Reprezentarea schematică a celor trei forme diferite de organizare a receptorului $\gamma\delta$. Unele lanţuri au reziduuri Cys la nivelul cărora realizează legături disulfidice (forma 1) iar altele nu au astfel de legături inter--lanţ (formele 2 şi 3) (după S. Porcelli şi col.).

proteinele de şoc termic, înalt conservate în cursul evoluţiei, exprimate atât pe bacterii cât şi pe celule eukariote expuse unor condiţii de stres. În comparaţie cu limfocitele cu TCR$\gamma\ \delta$, cele cu TCR$\alpha\ \beta$ se pare că au apărut mai recent în cursul evoluţiei filogenetice.

RECEPTORII Fc (FcR)

Numeroase celule exprimă pe suprafaţa lor receptori pentru fragmentul cristalizabil *(Fc)* al moleculelor de imunoglobuline aparţinând claselor IgG, IgE, IgM, IgA sau IgD, notaţi cu simbolurile lanţurilor grele ale moleculelor respective: Fc$\gamma$R, Fc$\varepsilon$R, Fc $\mu$R etc. Este important a nu se confunda termenul de "receptor pentru fragmentul *Fc*" cu cel de "fragment *Fc*". Structurile moleculare exprimate pe suprafaţa celulei prin care aceasta recunoaşte şi leagă "coada moleculelor de imunoglobulină", adică domeniul $C_H3$ sau $C_H4$ (şi uneori şi ultimele rezidii de la extremitatea COOH terminală a domeniului $C_H2$ ) al fragmentului cristalizabil *Fc*, sunt "receptorii pentru *Fc*" sau prescurtat "receptorii *Fc*" (*Fc*R) iar fragmentul cristalizabil legat este numit simplu fragment *Fc*.

*Fc*R se găsesc pe suprafaţa membranei plasmatice a trombocitelor, granulocitelor neutrofile, eozinofile sau bazofile, pe suprafaţa mastocitelor, celulelor *NK*, *K*, limfocitelor *B*, pe unele limfocite *T* etc. Sunt şi pe suprafaţa celulelor epiteliale, endoteliale, spermatozoizilor, celulelor sinciţiotrofoblaste şi chiar pe suprafaţa unor paraziţi cum ar fi trypanosomele, schistosomele etc. Funcţiile lor sunt multiple, fiind implicate în procesele de citotoxicitate anticorp-dependentă,

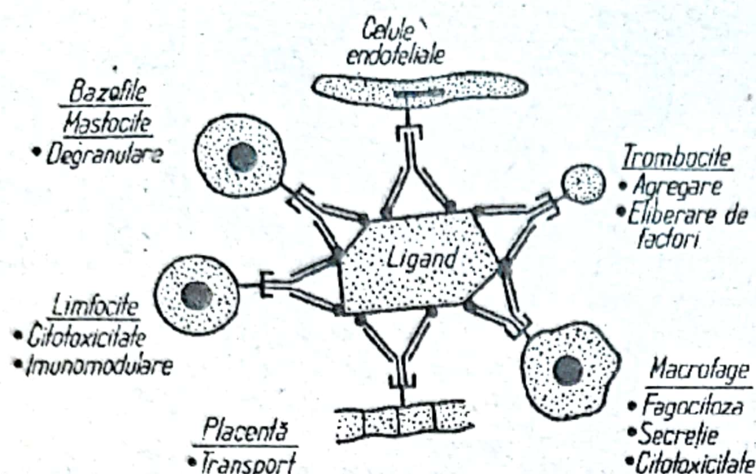



Fig.119. Reprezentarea schematică a principalelor funcţii ale receptorului Fc (FcR).

fagocitoză, transport transmembranar, degranulare, eliberare de metaboliţi toxici de oxigen etc. (fig. 119).

**Receptorii Fc pentru IgG (FcγR)** sunt exprimaţi pe diferite celule. Pe baza structurii lor chimice, specificităţii şi afinităţii pentru antigen, aparţin la trei clase distincte incluse în superfamilia de gene imunoglobulinice, cu o mare omologie în porţiunea extracelulară, dar deosebite la nivelul domeniilor membranare şi intracitoplasmatice. Familia receptorilor *Fcγ*RI este omogenă, pe când cea a *Fcγ*RII şi *Fcγ*RIII, generate de gene multiple, prezintă diverse forme moleculare (tabelul 81).

*Tabelul 81*

**Unele proprietăţi ale receptorilor Fc la om (după J.G.J. van de Winkel şi P.J.A. Capel)**

| Receptorul | CD | Greutatea moleculară | Gena | Afinitatea | Exprimat pe | | Leagă IgG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Constitutiv | Indus | |
| FcγRI | 64 | 72 kD | FcγRIA<br>FcγRIB<br>FcγRIC | Mare | Monocite<br>Macrofage | PMN<br>Eozinofile | 3>1>4>2<br>Monomer |
| FcγRII | 32 | 40 kD | FcγRIIA<br>FcγRIIB | Mică | Monocite<br>Macrofage<br>Bazofile<br>Eozinofile<br>Celule *B*<br>Trombocite<br>Langerhans<br>Celule endoteliale | | IIA<br>3>1>2>4<br>IIB<br>3>1>4>2<br>Polimer |

| Receptorul | CD | Greutatea moleculară | Gena | Afinitatea | Exprimat pe | | Leagă IgG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Constitutiv | Indus | |
| FcγRIII | 16 | 50-80 kD | FcγRIIIA | Medie | Monocite<br>Macrofage<br>LGL / *NK*<br>Celule *T* | Monocite | 1=3>>2,4<br><br>Complexe Atg-Atc |
| | | | FcγRIIIB | Slabă | Neutrofile | Eozinofile | |

*FcγRI* are o mare afinitate de legare a IgG monomer, dar leagă slab şi complexele anticorp IgG-antigen. Este unicul receptor care are trei domenii imunoglobulinice în porţiunea extracelulară (fig. 120). Este exprimat aproape în exclusivitate pe suprafaţa fagocitelor mononucleare, numărul lor variind între 1 000 şi 50 000 / celulă. La granulocitele PMN proaspăt izolate este un număr redus de receptori (cca. 1 000 / celulă), număr inductibil cu IFN γ care provoacă o creştere a lui de 5-10 ori. Nu este afectat numeric de alte citokine cum ar fi TNF GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3 sau IL-6. Rezistă la tratamentul cu tripsină şi pronază şi poate fi evidenţiat prin tehnica rozetelor EA (eritrocite+anticorpi) folosindu-se hematii cuplate cu IgG monomer uman. Dintre cele trei domenii extracelulare, două sunt omoloage domeniilor extracelulare ale Fc γRII şi Fc γR II, iar al treilea este distinct şi ar fi responsabil de afinitatea mare de legare a lui (fig. 121). Are un singur situs de legare a domeniului $C_H2$ al IgG şi poate transmite informaţia în interiorul celulei fără a mai fi necesară asocierea cu alte subunităţi.

*FcγRII* ar exista sub trei forme extracelulare identice - *Fc* γRIIA, *Fc* γRIIB1 şi FcγRIIB2 - dar cu domenii intracitoplasmatice diferite care, ca şi în cazul FcγRI, nu sunt asociate cu alte subunităţi. Au afinitate redusă pentru complexele IgG şi foarte slabă pentru IgG monomer (mIgG). Receptorul este exprimat practic pe toate celulele hematopoietice care exprimă *FcR*, cu excepţia eritrocitelor şi celulelor *NK*. Are două situsuri de legare, unul pentru domeniul $C_H2$ şi altul pentru $C_H3$. Pe suprafaţa unor celule există cca. 30 000-60 000 de *Fc*γRII, numărul lor fiind practic neinfluenţat de tratarea acestora cu citokine. Este slab exprimat pe trombocite (cca. 1 000/celulă).

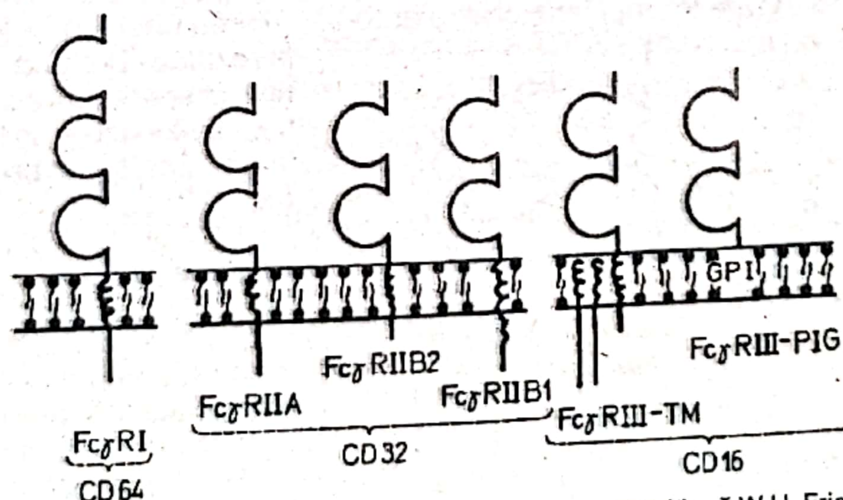



Fig.120. Structura receptorilor pentru Fc: CD64, CD32, CD16 (după W.H. Fridman).

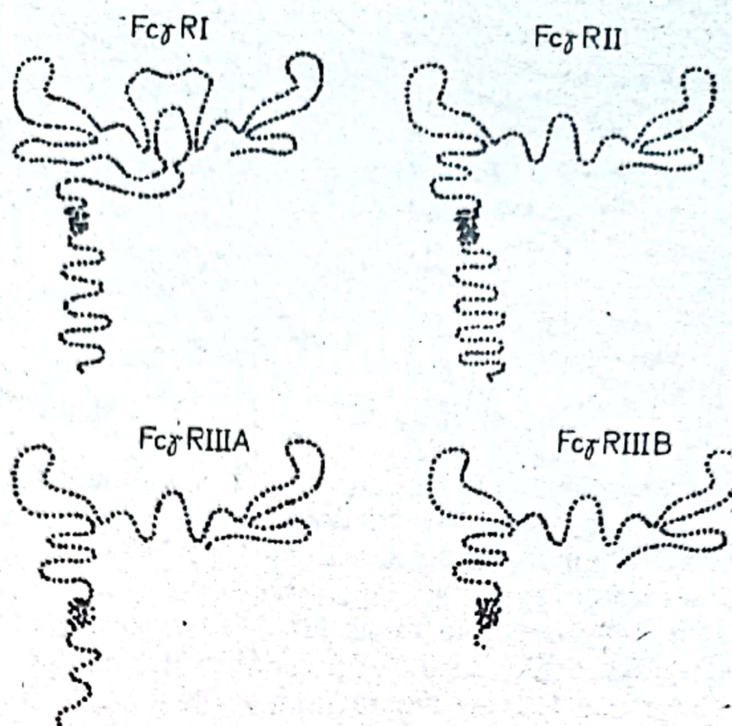



Fig.121. Receptorii Fcg I, II şi III, A sau B pentru IgG (după J,V.Ravetch şi J.P. Kinet).

Proteazele cresc afinitatea *Fc* γRII pentru IgG, fapt extrem de important *in vivo*, mai ales în inflamaţii unde sunt prezente diferite enzime. Un indicator pentru acest receptor este testul EA cu eritrocite cuplate cu IgG1 de şoarece, rozetarea fiind puternic activată după tratarea celulelor cu proteaze. Celulele care exprimă *Fc* γRI leagă hematiile sensibilizate cu IgG uman cu funcţie de anticorpi anti-antigenul D *(Rh)*, pe când cele care exprimă *Fcγ*RII nu leagă aceste hematii, testul putând face distincţia dintre cei doi receptori.

Se pare că *Fcγ* RII are un rol major în activarea şi reglarea activităţii limfocitelor *B*. Imediat după stimulul antigenic, celulele *B* exprimă *Fcγ*RII cu o capacitate slabă de legare, după care pierde acest receptor, pentru ca într-o fază ulterioară, de fapt între fazele de evoluţie G1 şi *S*, să-l exprime foarte intens. Acest receptor nu poate induce activitatea kinazică intracelular, motiv pentru care este necesară legarea încrucişată a receptorului pentru antigen din clasa IgM cu *Fcγ*RII (fig. 122). După această legare încrucişată, creşte autofosforilarea unei tirozin-kinaze (Fyn) la reziduul Tyr, urmată de fosforilarea şi activarea altor serin- şi treonin-kinaze şi, în final, fosforilarea *Fcγ*RII la nivelul serinei (fig. 123).

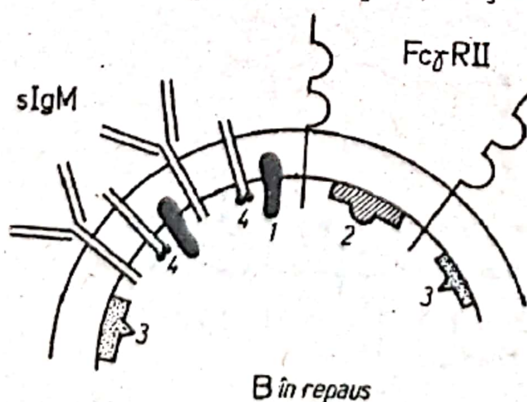



Fig.122. Protein-tirozin-kinaza Fyn (1) şi FγRII la celula B în repaus sunt asociate (după G. Sarmay).

Aşadar, *Fcγ*RII exprimat pe limfocitele *B* joacă un rol important în reglarea sintezei anticorpilor, legarea încrucişată a lor cu receptorii de natură imunoglobulinică pentru antigen (IgM) inhibând sinteza.

*Fcγ*RIII leagă complexele IgG1 şi IgG3, fiind din acest

punct de vedere asemănător cu *FcγRII*. Este un polipeptid cu 233 de reziduuri de aminoacizi, cu un domeniu extracelular format din două bucle asemănătoare imunoglobulinelor. Ar exista cel puţin două forme moleculare distincte: una *FcγRIIIA* sau *FcγR-TM*, şi alta *FcγRIIIB* sau *FcγRIII-PIG*. Ultima este exprimată pe membrana plasmatică a granulocitelor PMN în conexiune cu glicozil-fosfatidil-inozitolul. Anticorpii monoclonali anti--*FcγRIII* (CD16) recunosc în special epitopii exprimaţi pe *FcγRIII* de pe celulele *NK*.

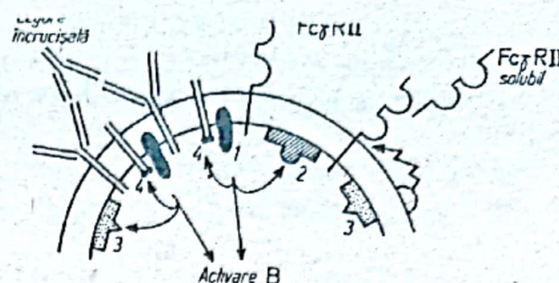



Fig.123. Celula B în curs de activare. Legarea încrucişată a IgM membranare duce la autofosforilarea şi activarea diferitelor substraturi, inclusiv kinazele serice (2) şi treonina (3). Simultan, serin-proteazele similare tripsinei clivează FcgRII în faza de activare a celulei B, blocând astfel semnalele negative care ar putea fi recepţionate de FcγRII şi care ar bloca activarea celulei (după G. Sarmay).

*FcγRIII-PIG* se leagă deci la membrana celulară printr-un fosfatidil-inozitol-glican (PIG), deosebindu-se de *FcγRIII-TM* exprimat pe macrofage şi celulele *NK,* unde de altfel este relativ slab reprezentat, fiind doar 1 000-1 500 receptori/celulă în comparaţie cu 100 000-200 000 / celulă la PMN. Numărul lor nu este influenţat de citokine, cu excepţia TNF care provoacă o scădere până la 50-60% din nivelul normal, probabil datorită activării fosfolipazelor endogene şi în special a fosfolipazei C (PLC) care ar cliva PIG "dezlegând" astfel receptorul de membrană (fig. 124).

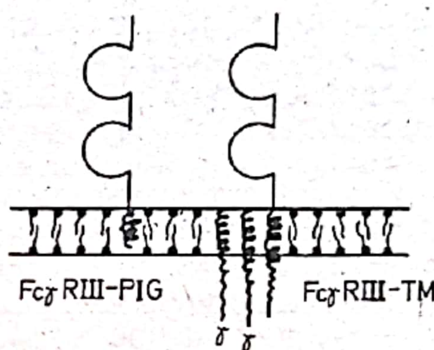



Fig.124. Receptorul FcγRIII transmembranar (FcγRIII-TM) şi cel asociat cu fosfatidil-inozitol-glicanul (FcγRIII-PIG) (după W.H. Fridman).

Receptorii *Fc* sunt exprimaţi pe toate celulele hematopoietice, cu excepţia hematiilor, precum şi pe alte celule, ca de pildă pe cele endoteliale placentare, exercitând o gamă largă de funcţii biologice (tabelul 82). Astfel, *FcγRI* contribuie la realizarea fagocitozei opsonice, la citotoxicitatea ADCC, activează prezentarea antigenului de către celulele APC asigurând rezistenţa organismului faţă de infecţii.

Receptorii *FcγRII* interacţionează cu complexele IgG2 şi mediază fagocitoza opsonică, iar *FcγRIII* realizează după unii citotoxicitatea ADCC, eliberarea de enzime lizozomale şi $O^{-}_{2}$, fiind foarte activ în fagocitarea hematiilor care au fixat specific anticorpii.

Toate cele trei clase de receptori *Fc* se găsesc şi sub formă solubilă în circulaţie, desprinderea lor realizându-se prin diferite mecanisme. Serul uman conţine mari cantităţi de *FcγRIIIB* eliberaţi probabil de la nivelul granulocitelor PMN ca urmare a activării unor serin-proteaze. Unii susţin că nivelul ridicat de FcγRIIIB în ser ar coincide cu un potenţial ridicat de apărare antibacteriană. Problema este discutabilă, deoarece recent s-a constatat că în serul bolnavilor cu infecţii

**Unele funcţii biologice ale receptorilor Fc (după J.G.J. Van de Winkel şi P.J.A. Capel)**

| Funcţia | FcγRI | FcγRII | FcγRIII | |
|---|---|---|---|---|
| | | | FcγRIIIA | FcγRIIIB |
| Fagocitoza | + | + | + | -/+ |
| Generarea de $O_2$ | + | + | + | -/+ |
| Citotoxicitatea ADCC faţă de: | | | | |
| - celule tumorale | + | + | + | -/+ |
| - eritrocite | + | + | + | + |
| Eliberarea de mediatori: | | | | |
| - enzime lizozomale | ? | + | + | + |
| - TNFα | + | + | + | ? |
| - IL-1 | + | + | ? | ? |
| - IL-6 | + | + | ? | ? |
| Activarea prezentării antigenului | + | + | + | ? |
| Reglarea sintezei de imunoglobuline | - | + | - | - |

stafilococice există un prag scăzut de asemenea receptori, care competiţionează cu *Fc* înhibând fagocitoza opsonică a granulocitelor PMN.

**Receptorii Fc pentru IgE (FcεR)** sunt prezenţi pe membrana plasmatică a granulocitelor bazofile, eozinofile, a mastocitelor, trombocitelor şi în mai mică măsură pe limfocitele *B*, o parte din limfocitele *T*, monocite şi macrofage. Se cunosc două clase distincte: FcεRI şi Fc εRII (fig. 125). FcεRI este un receptor de mare afinitate, dar cu o distribuţie restrânsă la un număr mic de tipuri de celule.

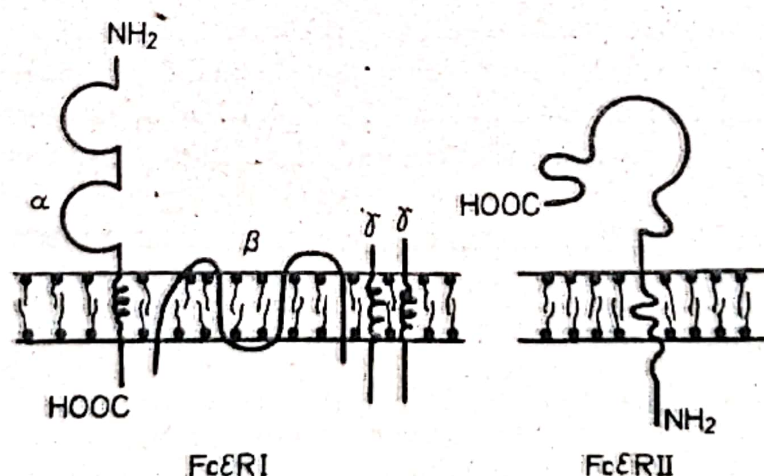



Fig. 125. Receptorii Fcε de tip I şi II. FcεRI de tip imunoglobulinic, pentru a fi funcţional, are asociate lanţurile $\beta$ şi $\gamma$. Receptorul FcεRII este un monomer de tip lectinic (după W.H. Fridman).

Este prezent numai pe mastocite, pe bazofile şi pe limfocitele capabile să lege moleculele de IgE. Are un lanţ $\alpha$ cu două bucle la nivelul domeniului extracelular care necesită, pentru a fi activ, asocierea cu alte două lanţuri, $\beta$ şi $\gamma$ ale căror domenii intracitoplasmatice sunt absolut necesare pentru transmiterea informaţiei. Există un singur lanţ $\beta$ care are ambele extremităţi, $NH_2$ şi COOH terminale, implantate în citoplasmă şi două lanţuri $\gamma$. Are asociate tirozin-kinaza, $p56^{fyn}$ şi $pp60^{SRC}$.

Receptorul *Fcε*RII există sub două forme moleculare: *Fcε*RIIa, cu afinitate redusă, constanta de legare fiind de $10^6$-$10^7$ $M^{-1}$, are o distribuţie restrânsă, fiind prezent pe limfocitele *B* "virgine" şi pe cele activate $\mu^+\delta^+$, dar nu pe cele care au comutat spre IgG sau IgA; pe monocite, macrofage, trombocite, eozinofile, celule dendritice şi pe limfocitele *T* este exprimat *Fcε* RIIb.

*Fcε* RIIa mediază endocitoza complexelor IgE-antigen de către limfocitele *B*, pe când *Fcε* RIIb, fagocitoza particulelor învelite cu IgE, acţionând deci în situaţii în care pragul moleculelor IgE este mare, cum este cazul în bolile parazitare. Se pare că *Fcε*RIIa intervine în maturarea şi activarea limfocitelor *B*, iar *Fcε*RIIb în răspunsul la alergene şi paraziţi.

Pe suprafaţa unei celule ar exista cca. $10^5$ *Fcε* RII. Datorită distribuţiei sale largi în populaţiile celulare ale organismului, *Fcε*RII este şi cel mai bine cunoscut. Este o glicoproteină de cca. 45 kD asociată spaţial cu IgG de pe membrana limfocitelor *B* şi cu HLA-DR, cu un situs de glicozilare la poziţia 64 şi unul de clivare la poziţia 81 datorită căruia se poate desprinde de pe celulă şi ajunge în circulaţie sub formă de fragmente de 35, 25 şi 12 kD, fragmente care, deşi libere, îşi păstrează totuşi capacitatea de a lega moleculele IgE. *Fcε*RII se prezintă sub forma unui lanţ polipeptidic unic cu 321 reziduuri de aminoacizi, dintre care patru Cys, suficient pentru exprimarea funcţiei de receptor şi legarea domeniului *Cε*3 al IgE printr-o porţiune care ar corespunde aminoacidului din poziţia 123 (v. fig. 125; fig. 126). Este o proteină de membrană de tip II, cu extremitatea $NH_2$ inserată intracitoplasmatic. La om, cele două forme de *Fcε* RII diferă între ele la nivelul extremităţilor $NH_2$ intracitoplasmatice. Exprimarea *Fcε*R este favorizată de către moleculele libere de IgE şi de către IL-4. Limfocitele *B*, de exemplu, exprimă de 50 de ori mai mult *Fcε*RII când sunt stimulate cu IgE şi Il-4 şi numai de 35 de ori când sunt stimulate numai cu IgE sau numai cu IL-4. Agenţii care inhibă sinteza IgE, cum ar fi IFN-$\alpha$, IFN$\gamma$ $PGE_2$ şi alţii, blochează inducerea şi exprimarea *Fcε*RII.

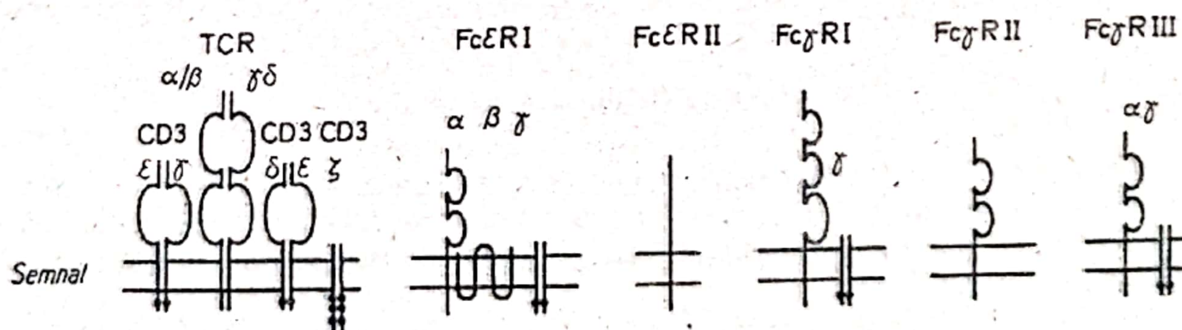



Fig.126. Asemănări şi deosebiri între receptorii pentru antigen de pe membrana limfocitelor T şi receptorii pentru Fc (FcεRI, FcεRII, FcγRII, FcγRIII).

**Receptorii pentru IgM (Fc$\mu$R)** sunt prezenţi pe limfocitele *B*, pe monocite, macrofage şi pe o parte din limfocitele *T* în repaus care exprimă receptori E de mare afinitate pentru hematiile de oaie. Unii susţin că aceşti receptori ar fi exprimaţi numai pe celulele *T* ajutătoare. Au aviditate pentru domeniul *C*$\mu$4 al moleculei de IgM, putând fi evidenţiaţi numai după o prealabilă incubare de câteva ore *in vitro*. Sunt sensibili la acţiunea tripsinei şi pronazei. La nivelul limfocitelor *T* ar fi o tranziţie

$Fc\gamma R \rightarrow Fc\mu R$ dependentă de nivelul glicozilării proteinelor, inhibiţia glicozilării favorizând exprimarea $Fc\gamma R$, iar activarea ei, exprimarea $Fc\mu R$.

**Receptorii pentru moleculele IgA ($Fc\alpha R$)** sunt proteine de tip imuno-globulinic cu două "bucle" extracelulare, un domeniu transmembranar şi unul intra-citoplasmatic, fără alte lanţuri asociate. Au greutatea moleculară de 50-70 kD şi leagă atât moleculele IgA serice cât şi pe cele secretorii, cu o constantă de afinitate de $5x10^7 M^{-1}$. Se găsesc pe granulocitele neutrofile, pe monocite, macrofage, limfocite *B*. Exprimarea lor pe membrana neutrofilelor este activată de prezenţa moleculelor de IgA şi controlată de diferiţi factori. De exemplu, GM-CSF sau G-CSF induc schimbări în afinitatea acestor receptori în sensul că celulele încep să exprime $Fc\alpha R$ de mare afinitate. Rezistă la acţiunea proteinazelor. Legarea moleculelor de IgA la $Fc\alpha R$ ar stimula multe funcţii ale celulei: producerea moleculelor toxice de oxigen, fagocitoza etc.

Receptorii pentru *Fc* ai moleculelor de imunoglobulină sunt implicaţi în declanşarea unor diverse funcţii celulare care depind atât de tipul de celulă pe care sunt exprimaţi cât şi de natura receptorului. Astfel mastocitele, după legarea fragmentului *Fc* la *Fc*R, eliberează diverşi mediatori celulari; macrofagele şi polimorfonuclearele fagocitează particulele opsonizate, celulele *K* îşi activează sistemul litic anticorp-dependent etc. *Fc*R intervin în catabolizarea şi eliminarea imunoglobulinelor îmbătrânite prin fagocitarea opsonică a complexelor formate de către moleculele de imunoglobuline denaturate recunoscute specific de către anticorpi anti- aceste molecule, în transportul transplacentar al moleculelor de IgG sau transintestinal şi transhepatic al celor IgA etc. Ar avea un rol important în reglarea răspunsului imun datorită acţiunii lor asupra limfocitelor *T* ajutătoare, *T* supresoare sau datorită modului lor de a interfera cu procesele activatoare ale limfocitelor *B*.

Le revine un rol important în citotoxicitatea anticorp-dependentă (ADCC), care este un mijloc de apărare atât împotriva celulelor eucariote cât şi împotriva unor paraziţi. Mulţi receptori, ca de pildă $Fc\varepsilon RII$, activează eliberarea mediatorilor cu rol în procesele inflamatorii. Tot ei au rol critic în proliferarea limfocitelor *B* indusă de IL-4, dar nu de alte limfokine.

În afară de rozetele EA, *Fc*R mai pot fi identificaţi cu ajutorul rozetelor ES (eritrocite cu proteina A stafilococică) sau prin tehnici de imunofluorescenţă în care se folosesc molecule de imunoglobuline marcate cu izotiocianat de fluoresceină.

## RECEPTORII PENTRU COMPLEMENT (CR)

Pe membrana celulelor există peste 15 structuri capabile să interacţioneze cu proteinele rezultate din clivarea sistemului complement. Unele dintre acestea au rol în reglarea funcţiilor complementului iar altele servesc ca receptori de tip 1,2 sau 3 (CR1, CR2, CR3).

CR1 leagă C1q, C3b, C4b, CR2 leagă iC3b (produsul de clivaj al C3b de către factorul I şi cofactorii săi) exprimat pe limfocitele *B*, iar CR3 leagă iC3b exprimat pe granulocite şi macrofage. Cel mai răspândit şi mai bine studiat este CR1, prezent pe limfocitele *B*, trombocite, celule endoteliale, fibroblaste etc. Este un complex macromolecular glicoproteic cu greutatea de 60-70 kD care conţine cca. 23% acid uronic şi cca. 21% galactozamină.

Pe membrana unor celule, cum este cazul limfocitelor *T*, există un număr mic de receptori pentru complement care leagă 1-2 din componentele acestuia, în timp ce pe alte celule, cum ar fi granulocitele PMN, sunt exprimaţi în număr mare receptorii pentru mai multe componente ale complementului. CR fixează atât com-

ponentele omoloage ale complementului cât şi pe cele heteroloage, fenomenul putând fi evidenţiat prin tehnica rozetelor EAC, în care celulele bănuite a fi $CR^+$ sunt incubate cu hematii în amestec cu ser imun anti-hematii şi complement deficitar în componenta C5, pentru a se evita liza hematiilor (EAC = eritrocite +anticorp+ complement).

Spre deosebire de receptorii pentru *Fc*, receptorii pentru complement sunt sensibili la acţiunea tripsinei şi au multiple funcţii biologice, dintre care încă multe sunt insuficient cunoscute. Ar interveni în reacţii de citotoxicitate mediată celular, permiţând celulei efectoare distrugerea ţintei care a fixat anticorpul IgM şi unele fracţiuni ale complementului, ar facilita eliminarea celulelor îmbătrânite, ar elibera semnale amplificatoare necesare activării celulelor *B* care au interacţionat cu antigenul etc. (tabelul 83).

*Tabelul 83*

**Receptori pentru unele componente ale complementului pe membrana diferitelor celule. Efectul recunoaşterii ligandului de către receptori asupra celulelor respective (după D. Fearon şi W. Wong)**

| Receptorul | Tipul de celulă pe care este exprimat | Nr. de receptori pe o celulă | Răspunsul celulei la interacţia ligand+receptor |
|---|---|---|---|
| $C_{1}q$ | Neutrofile | ? | Activarea proceselor oxidative |
| | Monocite | ? | şi a citotoxicităţii ADCC |
| | Celule K | ? | |
| | Limfocite B | ? | |
| $C_{3}a$ | Mastocite | ? | Eliberarea histaminei şi a altor |
| $C_{4}a$ | Polimorfonucleare | ? | amine vasoactive |
| | Muşchi netezi | ? | |
| $C_{3}b$ | Eritrocite | 500-600 | Eliminarea complexelor imune, |
| | Neutrofile | 20 000-40 000 | activarea fagocitozei |
| | Monocite/macrofage | 20 000-40 000 | |
| | Eozinofile | ? | |
| | Pe 15-20% din limfocite *T* | Nr. foarte mic | |
| $C_{3}c$ | Celule Daudi | ? | ? |
| $C_{3}e$ | Neutrofile | 600 000-700 000 | Activarea eliberării precursorilor |
| | Morfonucleare | 70 000-80 000 | medulari |
| $C_{5}a$ | Mastocite | ? | Sinteza şi secreţia leukotrienilor, |
| | Neutrofile | 40 000-50 000 | activarea chemotaxiei, a exprimă- |
| | Bazofile | ? | rii receptorului $C_{3}b$ |
| | Eozinofile | ? | |
| | Monocite/macrofage | ? | |
| Factorul H | Limfocite B | ? | Activează procesele oxidative, |
| | Monocite | 40 000-4 000 000 | secreţia factorului I, proliferarea |
| | Neutrofile | 40 000-4 000 000 | la mitogene |

Fixarea unor componente ale complementului, fie direct la bacterii, fie la molecule de anticorp care s-au fixat specific pe acestea, accelerează eliminarea lor prin procese de fagocitoză opsonică. Receptorii de tip CR2 de pe limfocitele *B* ar amplifica răspunsul proliferativ al acestora la stimulii antigenici.

### RECEPTORUL PENTRU ERITROCITE DE OAIE (RECEPTORUL E SAU RE)

Este un monomer de 50 KD prezent pe limfocitele *T*, făcând parte, ca moleculă accesorie, din receptorul pentru antigen al acestor celule. Este un marker limfocitar *T*. Leagă spontan eritrocitele de oaie, proces cunoscut sub denumirea

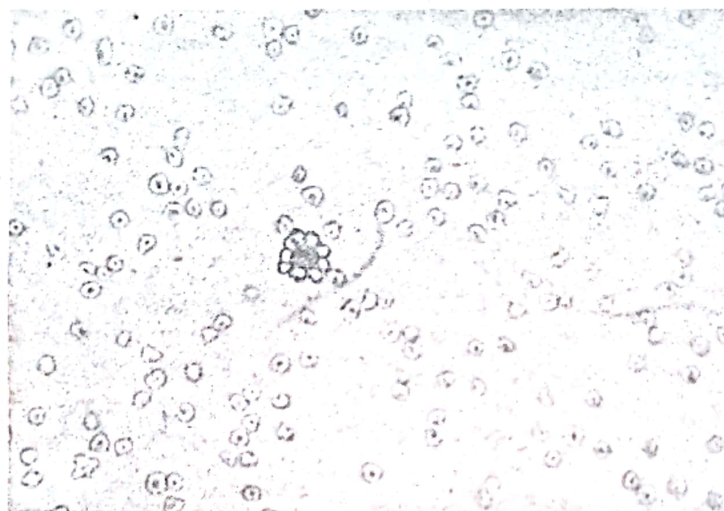


Fig.127. "Rozetă" formată de limfocitul T uman care a legat prin receptorul E (CD2) hematiile de oaie.

de rozete E (fig. 127). Legarea nu este un simplu fenomen fizic, ci o interacţie în care sunt antrenate mecanisme complexe, activitatea receptorului putând fi modulată de către diferiţi factori care intervin modificând structura membranei celulare. Se desprind de pe membrană ajungând în circulaţie, în cantităţi foarte mici la persoanele normale, dar destul de mari la cele cu depresii imune şi în special la leucemii limfatice cronice, melanoame, sarcoame, boala Hodgkin etc. Forma sa solubilă are un efect supresor asupra răspunsului imun şi asupra răspunsului limfocitelor *T* la stimulii policlonali *in vitro,* interferând cu activitatea polimerazei ADN. Poate fi desprins experimental de pe celule prin tratarea acestora cu KCl 3*M*, prin incubarea timp de o oră la +45°C, prin proteoliză enzimatică cu tripsină sau chimotripsină sau prin blastogeneză. Rezistenţa la tratamentul termic este o caracteristică a acestui receptor atunci când este exprimat pe limfocitele *CD*8$^{+}$, caracteristică ce poate fi utilizată ca un mijloc relativ comod de identificare a populaţiilor de limfocite *T* supresoare din circulaţie. Receptorul E (*CD*2) are un rol important în cooperarea limfocitelor *T* cu celulele prezentatoare de antigen (APC), realizând legarea LFA-3 de pe membrana APC şi conexiunile între cele două celule în vederea transmiterii informaţiei despre antigen celulelor *T*.

Este exprimat pe toate celulele prokariote sau eukariote care se multiplică activ: bacterii, celule embrionare, limfocite stimulate, celule neoplazice etc., fiind un component esenţial pentru legarea transferinei, o glicoproteină care fixează ionii de Fe ce vor servi celulei ca sursă de energie. Receptorul este un dimer de tip lectinic constând din două subunităţi identice, a câte 95 kD, legate între ele prin legături disulfidice, fiecare receptor putând lega două molecule de transferină, proteina majoră de transport a $Fe^{2+}$. Domeniile extracitoplasmatic şi transmembranar au câte patru reziduuri Cys. După ataşarea la receptor, complexul transferină--$Fe^{2+}$ este internalizat, $Fe^{2+}$ fiind desprins în vederea stocării lui iar receptorul, care încă mai are legată transferina, exprimat pe suprafaţa membranei şi apoi eliminat prin clivaj enzimatic. Eritrocitele imature, limfocitele activate, celulele neoplazice necesită $Fe^{2+}$ pentru replicarea lor, în care scop exprimă pe membrană receptori pentru transferină.

Cu toate că transferina se găseşte din abundenţă în ser, totuşi, limfocitele normale din sângele periferic sau cele care sunt în repaus nu exprimă acest receptor. După stimularea lor, el este imediat exprimat, intensitatea exprimării fiind condiţionată de semnalele extracelulare primite şi de stadiile de activare în care se găseşte celula. În cazul limfocitelor *T* stimulate cu mitogene, de pildă, ar fi următoarele seçvenţe în modularea receptorilor pentru transferină: a) la celula în repaus, gena care codifică pentru acest receptor este blocată şi, deci, inactivă; b) după contactul celulei cu lectina, gena este deblocată şi se activează sinteza receptorului; c) exprimarea receptorului este amplificată de IL-2 exogenă care induce o depleţie a ionilor de Fe intracelulari şi necesitatea introducerii altor ioni din afara celulei.

Aşadar, la celulele în repaus, genele care-i codifică sinteza, localizate pe cromozomul 3, nu se exprimă, sunt "tăcute". După stimul, funcţia lor se activează, începe sinteza receptorului, exprimarea lui pe membrană, procese amplificate de către IL-2 exogenă, care au loc în faza de multiplicare $G_1$ târzie şi care sunt puternic inhibate de către "calcitriol", un compus al vitaminei D. Efectul antiproliferativ al IFN$\alpha$ asupra liniilor celulare limfoblastoide sau asupra limfocitelor stimulate *in vitro* cu PHA este consecinţa inhibiţiei exprimării receptorului pentru transferină. Receptorii leagă de preferinţă transferina omoloagă care a fixat ioni de Fe cu diferite valenţe, de regulă $Fe^{2+}$ sau $Fe^{3+}$dar, posibil şi $Fe^{1+}$sau $Fe^{5+}$, jocul electronilor, trecerea ionilor de la o valenţă la alta constituind sursa de energie necesară celulei în faza activă de multiplicare. În cazul limfocitelor *T*, exprimarea receptorului pentru IL-2 o precede pe cea a receptorului pentru transferină.

Evidenţierea receptorilor pe membrana celulelor se poate face prin metode radioizotopice, prin tehnici de rozetare cu eritrocitele la care s-a legat transferina cu ajutorul $CrCl_3$, prin tehnici de imunofluorescenţă etc. Rolul acestor receptori este de a asigura celula în cursul diviziunii cu o sursă bogată de energie conferită de ionii de Fe. Din această cauză, administrarea în scop curativ a medicamentelor pe bază de $Fe^{2+}$ la pacienţii cu boli neoplazice, în scopul remedierii anemiilor care sunt frecvent asociate acestor boli, este profund dăunătoare. Inocularea de praparate conţinând Fe ar putea teoretic stimula eritropoieza şi asigura hem-ul cu materialul necesar, dar şansele ca acesta să fie rapid preluat de către celulele neoplazice aflate în diviziune activă sunt mult mai mari, aşa că terapia, în loc să ajute organismul, stimulează proliferarea tumorii.

Au rol în legarea diferiţilor mediatori solubili care controlează multiplicarea celulară sau exprimarea unor funcţii ale ei. Mai bine cunoscuţi sunt receptorii pentru interleukine, interferoni, TNF, diverşi factori de stimulare a coloniilor, hormoni etc.

**Receptorii pentru interleukine.** A fost determinată secvenţa primară a aminoacizilor care alcătuiesc polipeptidele receptorilor pentru IL-1$\alpha$, IL-1$\beta$, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 etc. interleukine cu rol de adevăraţi hormoni care intervin activ în procesele inflamatorii şi în reacţiile imune. Sunt cunoscute multe proprietăţi ale receptorilor pentru unele dintre aceste citokine (tabelul 84), majoritatea lor aparţinând familiei "hemopoietinei" sau superfamiliei "imunoglobuline" (fig. 128).

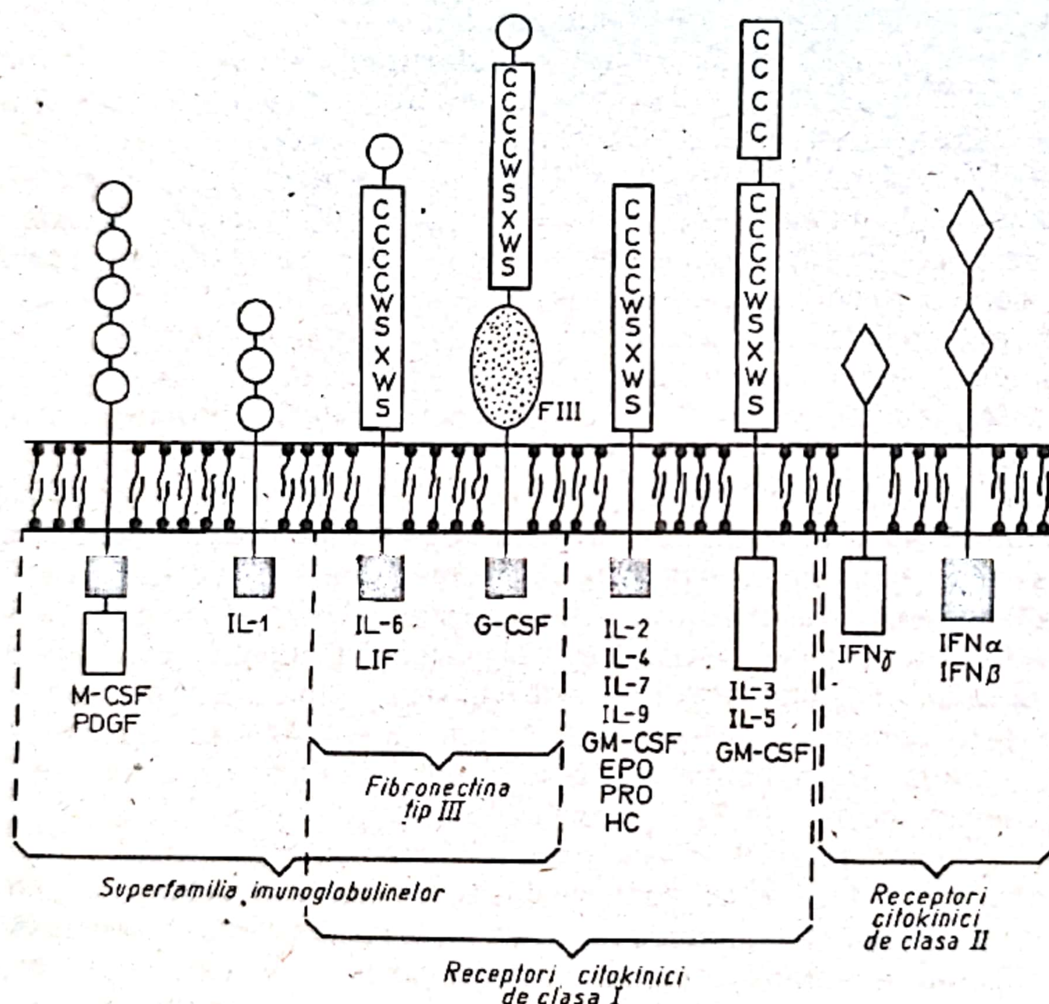



Fig.128. Superfamilia receptorilor de natură imunoglobulinică şi citokinică de clasele I şi II.

Receptorii din familia "hemopoietine" exprimaţi pe suprafaţa celulelor sistemului imun sunt IL-2 R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R şi GM-CSFR. Toţi sunt glicoproteine implantate în membrana celulară, cu extremitatea $NH_2$ terminală orientată extracelular şi cu un domeniu transmembranar hidrofob. Domeniul extracelular are 4 reziduuri Cys (cu excepţia IL-7R care are numai două reziduuri Cys) şi o secvenţă Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) localizată în apropierea domeniului transmembranar.

*Tabelul 84*

**Unele proprietăţi ale receptorilor pentru interleukine (după S.K.Dower şi col.)**

| Receptorul pentru | Tipul sau subunitatea | Greutatea moleculară (kD) | Afinitatea pentru ligand ($M^{-1}$) | Nr./celulă | Distribuţia celulară |
|---|---|---|---|---|---|
| IL-1 | Tip I<br>Tip II | 60 - 80 | $10^8$ - $10^{10}$ | $10^2$ - $10^4$ | Limfocite, fibroblaste, keratinocite, hepatocite, celule tumorale |
| IL-2 | I L - 2R$\alpha$<br>IL - 2R$\beta$<br>Complex$\alpha$ $\beta$ | 55<br>75 | $10^7$ - $10^8$<br>$10^8$ - $10^9$ | $10^3$ - $10^5$<br>$10^3$ - $10^4$<br>$10^{11}$ - $10^{12}$ | Monocite, limfocite *T* şi *B* activate |
| IL-3 | - | 120 - 140 | 5 x $10^7$ | $10^2$ - 5 x$10^3$ | Celule din seria mieloidă, limfocite *B* |
| IL-4 | - | 140 | 1- 2x$10^{10}$ | $10^2$- 5x$10^3$ | Diferite linii celulare, fibroblaste, limfocite *T, B* etc. |
| IL-5 | - | 46,5 | $10^8$ | $10^3$ - $10^4$ | Limfocite *B* activate, eozinofile |
| IL-6 | - | 80 | $10^9$ - $10^{10}$ | $10^2$ - $10^4$ | Diferite linii celulare, fibroblaste, limfocite *T, B* etc. |
| IL-7 | - | 70 - 75 | 1x$10^{10}$ | $10^2$ - $10^4$ | Celule din seria mielomonocitară, celule *T*, fibroblaste, pre -*B* |
| IL-8 | - | 65 şi 150 | $10^9$ | $10^3$ - $10^4$ | Granulocite / macrofage |

Receptorii din superfamilia imunoglobulinelor includ receptorii pentru antigen de pe limfocitele *B*, lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ ale receptorilor pentru antigen de pe membrana plasmatică a limfocitelor *T*, moleculele MHC de clasa I şi II, lanţurile polipeptidice ale *CD*4 şi *CD*8, CSF-R, IL-1R, PDGF-R şi IL-6R. De fapt, IL-6R aparţine atât familiei hemopoietine cât şi superfamiliei imunoglobuline de receptori. Receptorii acestei superfamilii au domeniile extracelulare cu legături disulfidice intralanţ care, exact ca şi la moleculele de imunoglobuline, formează "bucle". Ca şi în cazul membrilor familiei hemopoietine, membrii superfamiliei imunoglobuline sunt asemănători numai la nivelul domeniului extracelular unde au conformaţie similară imunoglobulinelor, dar nu şi la nivelul domeniului

intracitoplasmatic. Mulţi dintre ei se găsesc ca receptori, ancoraţi în membrana plasmatică a celulelor sau sub formă solubilă, care pot competiţiona cu cei ficşi în legarea citokinelor formând complexe receptor solubil/citokină.

*Receptorul pentru IL-1* este o glicoproteină care leagă atât moleculele de IL-1$\alpha$ cât şi pe cele de IL-1$\beta$ şi care aparţine superfamiliei imunoglobuline. Gena care-i controlează sinteza este pe cromozomul 2. Ar exista două tipuri de receptori diferiţi care ar transmite intracelular semnalele pe căi diferite: receptorul de tip I, cu greutatea moleculară de 80 kD, exprimat pe limfocitele *T*, fibroblaste şi celule endoteliale, şi receptorul de tip II de 60-65 kD exprimat pe celulele *T* activate, pe *B*, monocite, granulocitele PMN şi pe placentă. Ambele tipuri sunt similare la nivelul domeniilor extracelulare, dar se deosebesc la nivelul celor intracitoplasmatice. Tipul I are un segment intracitoplasmatic lung, cu 215 reziduuri de aminoacizi, iar tipul II are un segment scurt, doar de 29 reziduuri (fig. 129).

Se pare că pe o celulă există un număr mic de receptori cu afinitate de legare mare, dar această situaţie nu influenţează negativ activarea celulei, deoarece pentru aceasta sunt necesare doar 1-10 molecule de IL-1, adică este suficient să fie interesaţi doar 1-10 receptori. De altfel, numărul lor pe celulă variază în funcţie de tipul celulei şi de stadiul ei de activare. Pe timocite sunt cca. 10 receptori iar pe celulele *T* cca. 40 pentru ca după activare, numărul lor să crească de cca. 10 ori. În momentul în care molecula de IL-1 s-a fixat la IL-1R, se transmit intracelular semnale care induc activarea proteinkinazelor, creşterea pragului intracelular al cAMP urmată de activarea unei proteine identice cu NF-kB şi fixarea pe ADN. Totodată, au loc activarea fosfolipazei C (PLC) legată la fosfatidil-etanol-amină, activarea influxului de $Na^+$, producerii de diacilglicerol (DAG), exprimarea unor gene oncogene activatoare ale metabolismului şi multiplicării celulare (c-fos, c-myc, c-jun) etc.

Prezenţa IL-1R pe suprafaţa diferitelor celule este influenţată de alte citokine, care de regulă îi stimulează intensitatea exprimării. Este cazul GM-CSF, G-CSF, IL-4, PDGF etc. Inocularea *in vivo* a IL-1R solubil modulează funcţiile imune blocând hiperplazia ganglionilor limfatici la animalele inoculate cu celule alogene şi întârziind rejecţia alogrefelor.

*Receptorul pentru IL-2* este un complex format din lanţurile $\alpha$, cu greutatea moleculară de 55 kD şi afinitate înaltă de legare, şi lanţurile $\beta$, de 70-75 kD, cu afinitate joasă de legare, legate între ele prin legături disulfidice. Heterodimerul $\alpha\beta$ are regiuni variabile şi constante, similare moleculei de imunoglobulină. Gena care-i controlează sinteza este localizată pe cromozomul 10 şi are 8 exoni şi 7 introni. Întreaga moleculă are 272 de reziduuri de

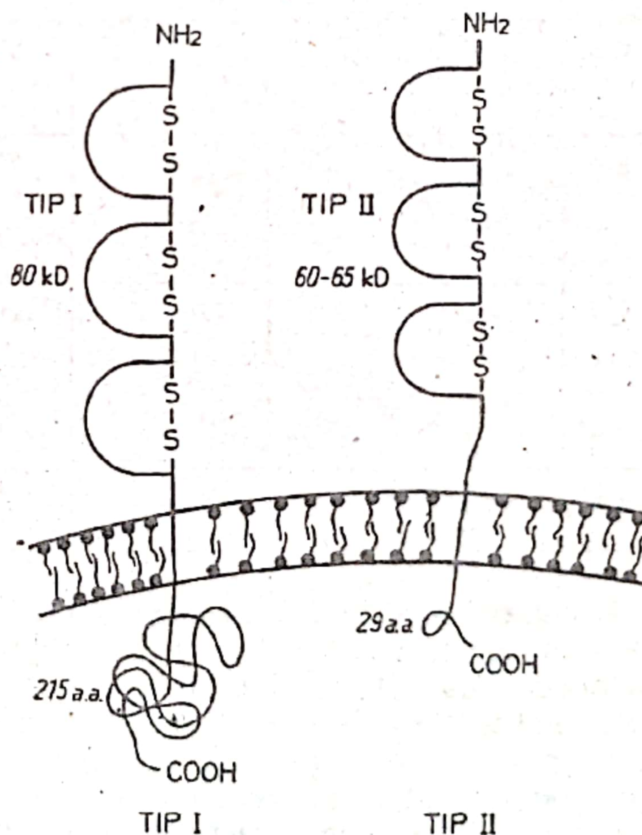



Fig.129. Receptorii pentru interleukina-1 (IL-1R) de tip I şi II.

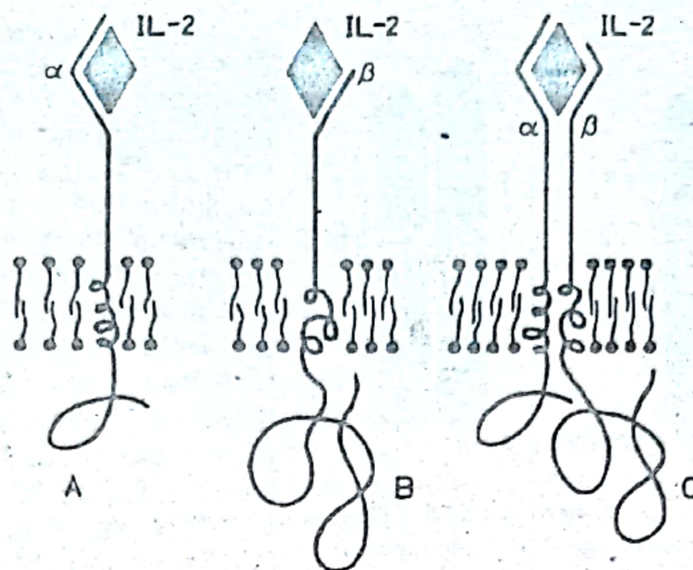



Fig.130. Posibilităţile ipotetice de realizare a variaţiei de intensitate în legarea IL-2 la receptorul ei.
A. Lanţul $\alpha$ leagă IL-2 pe o suprafaţă mai mare, realizând o afinitate de legare bună.
B. Lanţul $\beta$ fixează o suprafaţă mică, din care cauză leagă slab interleukina.
C. Ambele lanţuri realizează o legare puternică.

aminoacizi, cu 13 reziduuri de cys şi cu un domeniu intracitoplasmatic scurt, de numai 13 reziduuri, în care este prezentă serina cu rol în fosforilare. Când sunt împreună, lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ formează un complex care leagă IL-2 cu afinitatea foarte mare (fig. 130). Lanţul $\alpha$ este exprimat pe celulele în repaus, exprimarea lui crescând de 2,5 ori după stimularea celulelor, iar lanţul $\beta$ este prezent numai pe suprafaţa celulelor stimulate, dar nu şi pe cele în repaus. Receptorii pentru IL-2 nu sunt prezenţi în permanenţă pe membrana plasmatică, exprimarea lor fiind condiţionată de stimularea antigenică a limfocitelor. La nivelul limfocitelor *T* activate şi fosforilate numai în prezenţa IL-2, prima exprimată este oncogena c-myc, după care este activată gena care controlează sinteza IL-IR, însoţită de producerea de IFN$\gamma$ şi, ulterior, gena pentru transferină. Moleculele de IL-2, PHA, PMA sunt activatori ai exprimării lanţului $\alpha$ al IL-2 R.

Forma sa solubilă, cu greutatea de 40 kD, se găseşte în cantităţi mari în serul pacienţilor cu diferite boli, cum ar fi boala Hodgkin, leucemia limfatică cronică (LLC), leucemia cu "celule păroase" (hairy cell leukaemia), sindromul Sezary etc. Nivelul său seric are valoarea prognostică, scăderea spre limite normale fiind de bun augur.

*Receptorul pentru IL-3* este o glicoproteină de 72-140 kD prezentă pe suprafaţa celulelor din seria mieloidă şi pe suprafaţa limfocitelor *B*. Are greutatea moleculară fie de 72,5 kD fie de 140 kD dar, după incubarea celulelor la 37°C în prezenţa IL-3, are loc conversia proteinei de la 140 kD la 72,5 kD.

*Receptorul pentru IL-4* este o proteină de 139-140 kD cu afinitate mare de legare, a cărei exprimare este inhibată de ciclosporina A, dar este puternic activată consecutiv stimulării celulelor cu lectine. Larg răspândit pe diferite tipuri de celule, acest receptor (IL-4R) are un domeniu extracelular, unul transmembranar şi unul intracitoplasmatic. Există şi o formă solubilă a IL-4R care are aceeaşi afinitate de legare ca şi forma fixă şi care ar inhiba efectul stimulator al limfocitelor IL-4 asupra limfocitelor *B*.

*Receptorul pentru IL-5 (IL-5R)* este mai puţin cunoscut la om fiind, ca şi IL-8R şi TGF-R, mai bine studiat la şoarece. Are o mare analogie cu IL-3R, de care însă diferă prin greutatea moleculară. Ar exista IL-5R cu diferite afinităţi de legare.

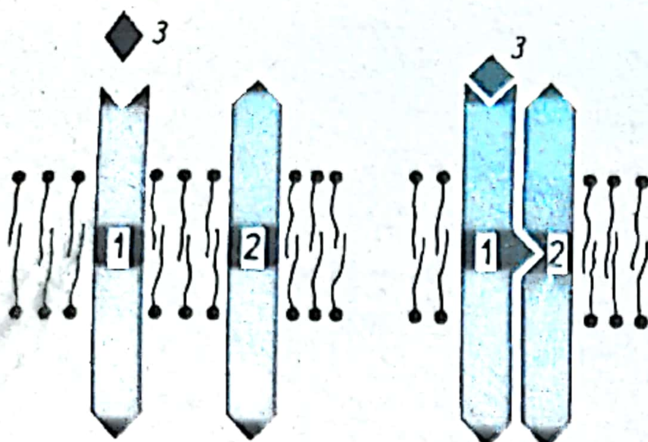



Fig.131. Receptorul pentru IL-6.

A. La celula în repaus, receptorul pentru IL-6 (1) este distanţat de glicoproteina gp 130 transductoare a semnalelor (2).

B. Legarea IL-6 (3) la receptor (1) induce apropierea acestuia de gp 130 şi o modificare sterică a lui, permiţând astfel transmiterea semnalului (după Hirano şi col.)

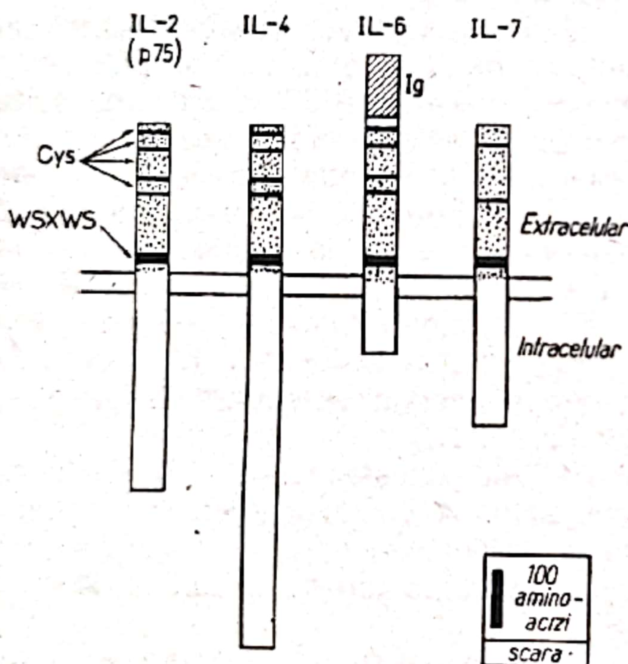



Fig.132. Receptorii pentru interleukina la om, care fac parte din familia receptorilor hemopoietinici. Barele orizontale subţiri reprezintă reziduurile de Cys iar cele groase WSXWS (Trp-SerXTrp-Ser) (după S.K.Dower şi col.).

*Receptorul pentru IL-6 (IL-6R)* este exprimat pe celulele limfoide şi nelimfoide, ca o expresie a activităţii multifuncţionale a acestei interleukine. De asemenea, este exprimat pe limfocitele *B* activate (100-600 receptori/celulă), dar nu pe *B* în repaus. Pe limfocitele *T*, este exprimat atât pe celulele activate cât şi pe cele în repaus (100-1000 receptori/celulă). Este o glicoproteină de 80 kD cu 449 reziduuri de aminoacizi şi cu două domenii extracitoplasmatice, dintre care unul cu 90 reziduuri ar aparţine superfamiliei imunoglobulinelor, iar altul superfamiliei citokinelor (vezi fig. 128), fiind similar IL-12R. Domeniul transmembranar are 28 reziduuri de aminoacizi, iar cel intracitoplasmatic cca. 82 de reziduuri. Domeniul intracitoplasmatic nu este esenţial pentru transmiterea semnalelor, deoarece nu are situsuri de legare nici pentru proteinkinaze nici pentru proteina G, aşa că nu este capabil să transmită mesajele primite din exterior. Transmiterea acestora este realizată de către o glicoproteină accesorie cu greutatea moleculară de 130 kD, care are 6 unităţi de molecule de fibronectină de tip III şi un situs de legare pentru proteina G. La celula în repaus, această glicoproteină este distanţată de receptor, pentru ca în momentul activării să se apropie şi să preia transmiterea intracelulară a semnalelor (fig. 131). Domeniul citoplasmatic al acesteia are 277 de reziduuri de aminoacizi, deşi primii 61 de lângă membrană sunt suficienţi pentru transmiterea semnalelor activatoare.

La subiecţii normali, forma solubilă a IL-6R este eliminată prin urină.

*Receptorul pentru IL-7 (IL-7R)* a fost clonat recent, dovedindu-se a fi un membru al familiei de receptori citokinici. Se găseşte atât ca formă fixă, de receptor membranar cât şi ca formă solubilă (fig. 132).

**Receptori pentru factori de stimulare a coloniilor (CSF-R)** sunt glicoproteine care au omologie cu familia imunoglobulinelor. Au un domeniu $NH_2$ extracelular, unul transmembranar hidrofob şi unul intracitoplasmatic, cu lungimi variabile şi

fără activitate kinazică (cu excepţia M-CSF). Toţi sunt foarte asemănători la nivelul unei regiuni de 210 reziduuri de la nivelul domeniului extracelular care fixează specific ligandul (fig. 133).

*Receptorul pentru factorul de stimulare a coloniilor de macrofage (M-CSFR)* este o glicoproteină de 165 kD cu activitate tirozin-kinazică, identică produsului proto-oncogenei c-fos, exprimată în principal pe membrana monocitelor şi macrofagelor, dar şi pe membrana trofoblaştilor şi celulelor Kupffer active. Exprimarea lui este necesară pentru diferenţierea precursorilor în secvenţa precursor → monoblast → promonocit → monocit → macrofag. Numărul lor creşte în cursul maturării celulelor.

*Receptorul pentru factorul de stimulare a granulocitelor şi macrofagelor (GM-CSFR),* cu greutatea moleculară 51 kD, este mai bine cunoscut la şoarece, unde ar exista două tipuri: unul de mare afinitate şi altul cu afinitate slabă pentru ligand. Este bine reprezentat pe celulele blastice imature, dar numărul lor scade o dată cu maturarea celulei, ajungând la maximum 1000/celulă. Este foarte asemănător cu IL-3R. La om, este exprimat pe celulele hematopoietice - granulocite, monocite, macrofage - şi nehematopoietice, cum ar fi unele celule carcinomatoase, melanomatoase, celule ale placentei etc. Numărul lor este relativ mic, variind între 50 şi 800 de receptori/celulă. După unii, ar exista un receptor unic, cu greutatea de cca. 130 kD, foarte sensibil la acţiunea proteazelor celulare.

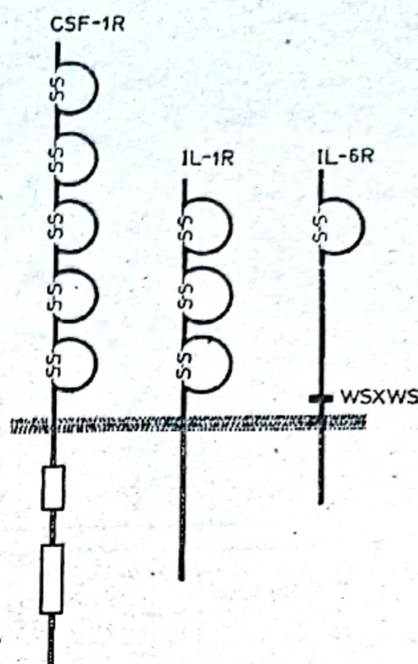



Fig.133. Receptori din familia superimunoglobulinelor. Domeniile imunoglobulinice formează, datorită reziduurilor conservate, bucle generate de legăturile -S-S-. Receptorul pentru IL-6 are conservate şi WSXWS. Dreptunghiurile domeniului citoplasmatic al CSF-1R indică regiunile de ataşare a tirozin-kinazei (după S.K. Dower şi col.).

*Receptorul pentru factorul de stimulare a granulocitelor (G-CSFR)* este o glicoproteină cu greutatea moleculară de 160 kD, foarte asemănătoare structural şi funcţional cu GM-CSFR.

**Receptorul pentru factorul de creştere a epiteliilor (EGFR)** are greutatea moleculară de 170 kD, un domeniu transmembranar şi unul citoplasmatic, tirozin-kinazic. Fixarea ligandului (EGF) la domeniul extracelular generează procesele de autofosforilare prin transmutarea $P^{3+}$ către tirozin-kinază şi creşterea masivă a nivelului intracelular al fosfotirozinei.

**Receptorul pentru factorul de activare a trombocitelor (PAF)** este o proteină care traversează membrana plasmatică de mai multe ori (fig. 134). Se găseşte pe suprafaţa trombocitelor şi a granulocitelor PMN, legat la proteina G. Mediază căile de transmitere a semnalelor, activează PLC, influenţează nivelul celular al $Ca^{2+}$ chemotaxia, eliberarea speciilor toxice de oxigen etc.

Una dintre cele mai interesante ipoteze care încearcă să explice mecanismele care stau la baza transmiterii transmembranare a semnalelor este fosforilarea receptorilor pentru factorii de creştere. De exemplu, după legarea EGF, G-CSF, insulinei etc. la receptorii lor, are loc autofosforilarea şi activarea tirozin-protein-kinazei, fosforilarea reziduurilor tirozin-kinazice putând juca un rol important în reglarea creşterii şi diferenţierii celulare. Toţi aceşti receptori au un domeniu

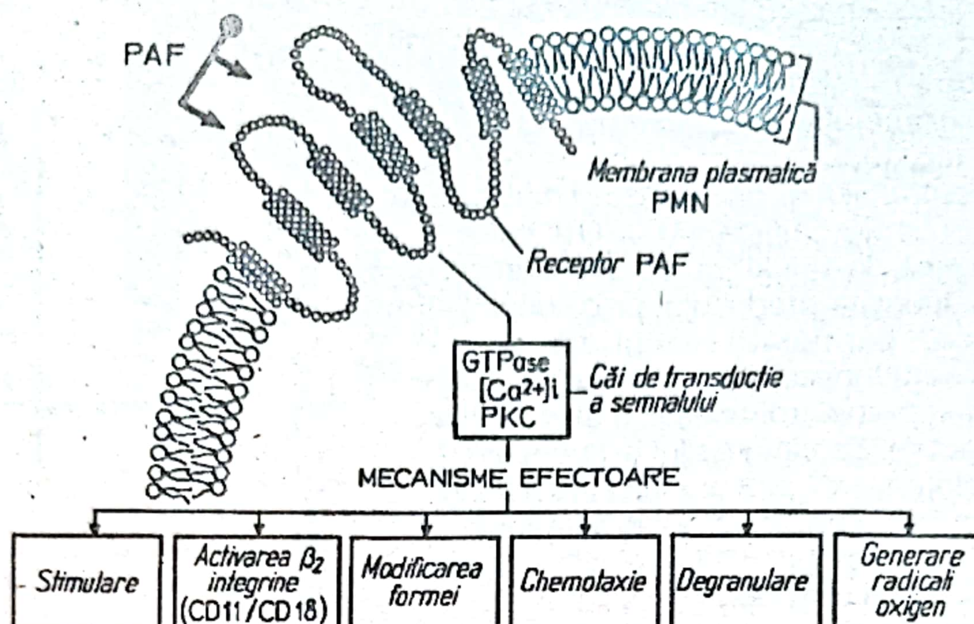



Fig.134. Receptorul pentru factorul de aglutinare a trombocitelor (PAF) de pe granulocitele PMN. PAF se leagă la un receptor de mare afinitate de la nivelul membranei PMN care traversează de 7 ori membrana plasmatică a acestor celule.

extracelular puternic glicozilat care fixează ligandul, un domeniu hidrofobic transmembranar şi unul citoplasmatic care conţine o regiune catalitică tirozin-kinazică.

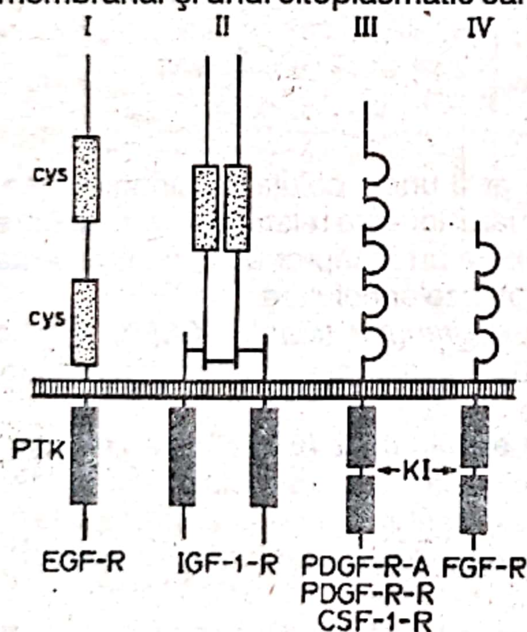



Fig.135. Reprezentarea plasmatică a celor patru subclase (I, II, III şi IV) de receptori tirozin kinazici (după A. Ullrich şi J. Schlessinger).

EGF-R = receptorul pentru factorul de creştere a epiteliilor; IGF-1R = receptor pentru insulină; FGF-R = receptorul pentru factorul de creştere a fibroblastelor; PDGF-R = receptorul pentru factorul de creştere a trombocitelor; KI = regiunea de inserţie a kinazelor; CSF-1R = receptorul pentru factorul de stimulare a creşterii coloniilor.

Pe baza caracteristicilor lor structurale, aceşti receptori au fost încadraţi în patru grupe diferite: grupa I cu două regiuni extracelulare bogate în reziduuri de cys, grupa II cu câte două lanţuri (heterodimer $\alpha_2 \beta_2$) şi secvenţe bogate în cys, şi grupele III şi IV cu 5, respectiv 3 regiuni extracelulare asemănătoare imunoglobulinelor şi cu domeniile citoplasmatice ale protein-tirozinkinazelor întrerupte (fig. 135). Aceste grupe de receptori prezintă diferite modificări şi transpoziţionări ale domeniilor lor după fixarea liganzilor (fig. 136).

**Receptorii pentru interferoni (IFN-R).** Se cunosc doi receptori: unul de tip I, sau cu greutatea moleculară de 110-140 kD, a cărui sinteză este controlată de către gene situate pe cromozomul 21, care leagă IFN$\alpha$ şi IFN$\beta$ şi altul de tip II, sau cu greutatea moleculară de 95-110 kD, cu gena pe cromozomul 6, care leagă IFN$\gamma$. Numărul lor este relativ mic, de cca. 200-10 000 de receptori/celulă, cu constanta de legare între $1 \cdot 10^{-9}$ şi $1 \cdot 10^{-10}$ M. Atât numărul cât şi afinitatea lor se modifică în funcţie de stadiul de diferenţiere şi proliferare a celulei.

Legarea IFN la receptori este necesară, dar nu suficientă pentru activarea celulei, aceasta solicitând şi alţi stimuli. Totuşi, dacă lipseşte stimulul transmis prin IFN-R, atunci răspunsul antiviral al celulei este inhibat. După legarea la receptor, IFN induce o serie de modificări intracelulare, ca de pildă creşterea fosforilării, modificări care conduc la activarea unor răspunsuri fiziologice cum ar fi apărarea antivirală, inhibiţia multiplicării, exprimarea antigenelor de histocompatibilitate etc.

La temperatura de 37°C are loc internalizarea complexelor IFN-IFN-R, internalizare inhibată de citocalazina B, care de altfel inhibă nu numai internalizarea dar şi formarea complexelor, sugerând o asociere a acestora cu citoscheletul celular.

Unele ipoteze susţin că legarea IFN la receptori activează PLC, proces care conduce la clivarea fosfolipazelor inozitolice, activarea PKC, stimularea influxului de $Ca^{2+}$ şi sinteza de LT sau PG via acid arahidonic (fig.137). În final, se ajunge la inhibiţia sintezei proteinelor şi blocarea multiplicării celulare.

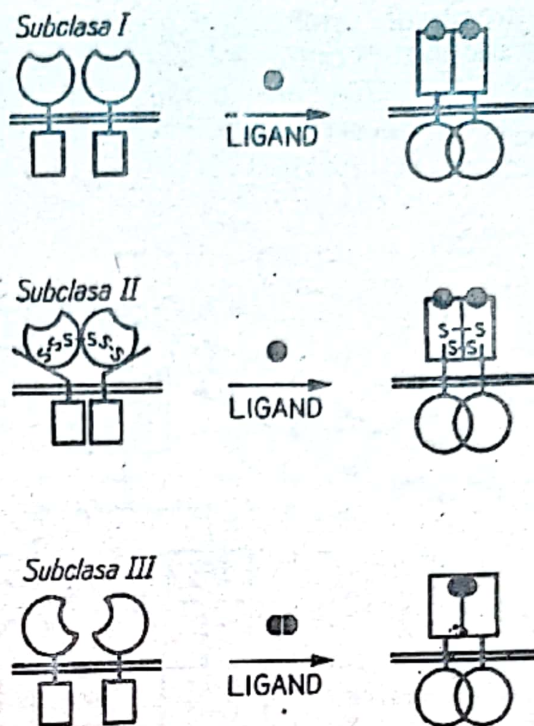



Fig.136. Modificări conformaţionale ale unor subclase de receptori tirozin-kinazici, consecutiv fixării ligandului (după A. Ullrich şi J. Schlessinger).

**Receptorii pentru factorul de necroză a tumorilor (TNF-R)** ar fi receptori de tip I şi tip II, bogaţi în reziduuri cys, fiecare dintre ei putând lega atât TNF$\alpha$ cât şi TNF$\beta$ (tabelul 85). Sunt între 1000-10 000 pe toate celulele eukariote, cu excepţia

*Tabelul 85*

**Principalele caracteristici fizico-chimice ale TNF-R**

| Caracteristica, funcţia sau localizarea | TNF-R de tip | |
|---|---|---|
| | I | II |
| Cromozomul pe care este gena | 12 | 1 |
| Numărul de exoni | 3 | 3 (?) |
| Numărul reziduurilor aminoacizilor la nivel: | | |
| - total | 455 | 461 |
| - leader | 29 | 22 |
| - domeniul extracelular | 182 | 235 |
| - domeniul transmembranar | 21 | 28 |
| - domeniul citoplasmatic | 223 | 176 |
| Greutatea moleculară (kD) | 55 | 75 |
| Nr. reziduuri cisteină | 24 | cca. 20 |
| Glicozilarea | prezentă | absentă |

eritrocitelor, unul având greutatea moleculară de 55 kD, cu 182 reziduuri de aminoacizi în domeniul extracelular, 20-22 la nivelul segmentului transmembranar şi 221-223 la nivelul domeniului intracitoplasmatic iar celălalt, cu greutatea de 75 kD şi cu un domeniu intracelular mai scurt cu 50 de reziduuri de aminoacizi.

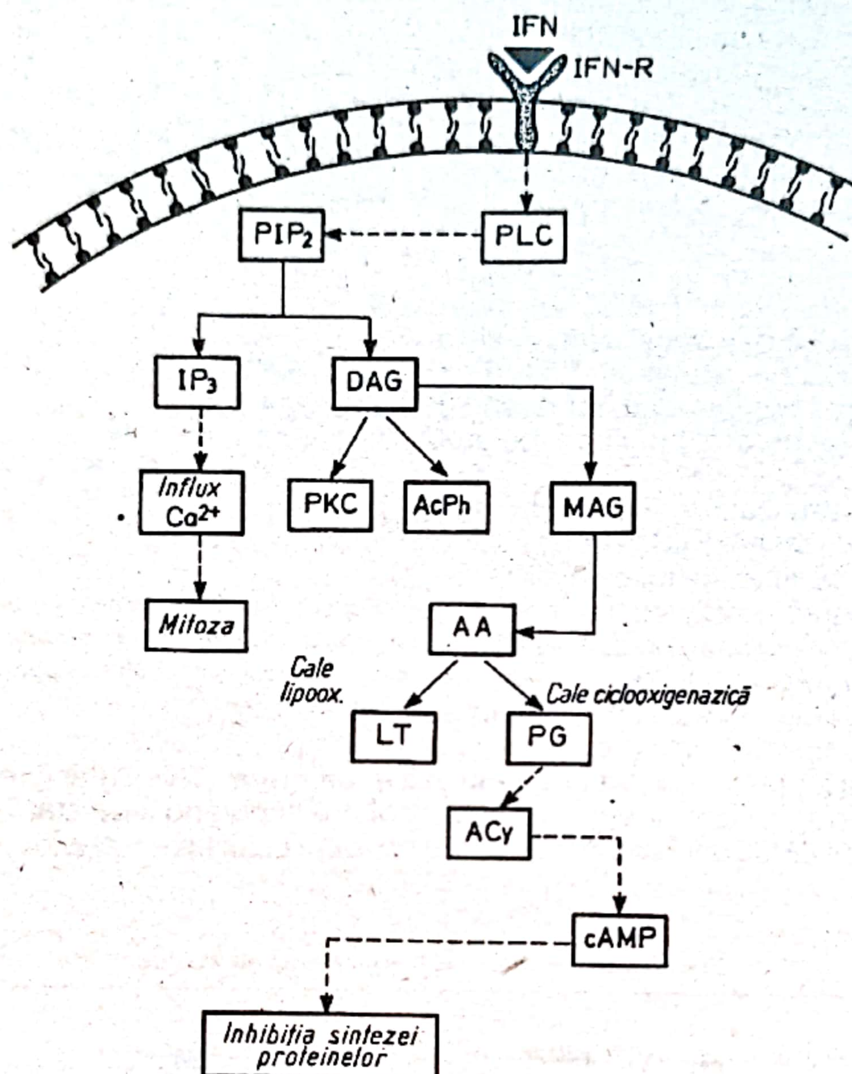



Fig.137. Reacţii metabolice declanşate în citoplasma celulelor, consecutiv fixării interferonilor (IFN) la receptorii lor (IFN-R).

PLC = fosfolipaza C; PIP2 = fosfatidil-inozitol-difosfat; IP3 = inozitol trifosfat; DAG = diacil-glicerol; PKC = protein-kinaza C; AcPh = acid fosfatidilic; AA = acid arahidonic; LT = leucotriene; PG = prostaglandine; ACy = adenilat-ciclaza; cAMP = adenozin-monofosfat-ciclic; MAG = monoacil glicerol.

———— = transformare, stimulare;

- - - - - - = modificare, activare.

- Aceşti receptori sunt de fapt două ramuri distincte ale unei familii moleculare, omologia dintre ei fiind destul de redusă (28%), fiecare putând fixa TNF$\alpha$ sau TNF$\beta$, fixare care este la originea activării factorului de transcriere NF-kB. Interesant este faptul că există o omologie mult mai mare (62-64%) între TNF uman şi

murin de tip I sau II decât între tipurile I şi II uman. Receptorul cu greutatea moleculară mai mare este exprimat predominant pe celulele din seria mieloidă, iar cel cu greutatea mai mică, pe celulele de tip epitelial. Ambii receptori sunt bine exprimaţi pe celulele neoplazice. Numărul lor pe suprafaţa celulelor nu este fix, fiind influenţat de o serie de factori (tabelul 86).

*Tabelul 86*

**Factori care stimulează sau inhibă exprimarea TNF-R pe membrana plasmatică a celulelor**

| Modificare numerică în sensul | Factorul care induce modificarea |
|---|---|
| Creşterii numărului de receptori | - Maturarea funcţională a celulei<br>- Prezenţa activatorilor proteinkinazelor<br>- Inductorii activării limfocitelor *T*<br>- Sinteza IL-2 |
| Scăderii numărului lor | - Colchicina (provoacă depolarizarea mitocondriilor)<br>- $H_2O_2$<br>- Vinblastina<br>- Epinefrina<br>- Insulina<br>- Somatostatina |

Formele solubile de TNF-R au fost identificate în urină la subiecţii normali şi în serul bolnavilor de cancer, dar nu în serul subiecţilor normali. Este foarte posibil ca prezenţa receptorilor solubili în serul pacienţilor cu boli neoplazice să fie expresia unei forme de protecţie a tumorii faţă de efectul toxic al TNF.

## RECEPTORII PENTRU HORMONI

Sunt situaţi atât la suprafaţa membranei plasmatice cât şi la nivelul citoplasmei sau chiar al nucleului, legarea hormonilor la receptori ducând la activarea sistemului enzimatic intracelular (v. tabelul 78).

Există receptori pentru glucocorticoizi cu rol antiinflamator, situaţi la nivelul citoplasmei, de unde complexul receptor-glucocorticoid este transferat la nucleu unde stimulează sinteza mARN şi, implicit, a proteinelor. Una dintre proteinele stimulate de către glucocorticoizi este "lipocortina" denumită şi "anexina-1", un membru al familiei anexinelor cu rol în reglarea glucocorticoizilor şi în controlul proceselor imune şi inflamatorii. Lipocortina este un antiinflamator marcant, cu o puternică acţiune inhibitoare a fosfolipazelor şi în special a $PLA_2$. Receptorii pentru lipocortină sunt două proteine cu greutatea moleculară de 15 şi 18 kD, exprimaţi pe monocite şi granulocitele PMN, dar nu şi pe limfocite.

La nivelul timocitelor şi limfocitelor sunt receptori pentru ACTH, pentru endorfinele $\alpha$ şi $\beta$, pentru oxitocine, arginine, vasopresine, somatostatine, hormoni de creştere, insulină, histamină, serotonină, adenozină, hormoni tiroidieni etc. iar

macrofagele şi limfocitele *Ts* au diferiţi receptori de mare afinitate pentru oestrogeni (dietilstilbestrol). Mulţi dintre aceşti hormoni pot activa doi receptori cu efecte diametral opuse. Astfel, adenozina în concentraţii mici, activează receptorii R1, iar în concentraţii mari, receptorii Ra. Histamina, în concentraţii mici activează receptorii $H_1$ iar în concentraţii mari, receptorii $H_2$ .

Receptorii pentru insulină de la nivelul diferitelor organe sunt dimeri formaţi din unităţile $\alpha$ şi $\beta$ glicozilate, ataşate covalent prin legături disulfidice. Subunitatea $\alpha$, de 135 kD, situată extracelular, leagă hormonul, iar subunitatea $\beta$, de 95 kD, este ancorată în membrana plasmatică printr-un segment helix hidrofobic cu activitate tirozinkinazică. După legarea insulinei la subunitatea $\alpha$, au loc autofosforilarea substratului $\beta$ şi stimularea activităţii kinazice a unor diferite substraturi tirozinice endogene şi exogene. După unii, insulina în concentraţii mici s-ar lega numai la aceşti receptori, iar în concentraţii mari s-ar lega şi la receptorii pentru somatostatină.

De dată mai recentă a fost identificat receptorul pentru hormonii de sex-oestradiol–17$\beta$ şi 5$\alpha$-dihidrotestosteron– la nivelul macrofagelor, hormoni responsabili de diferenţele în reactivitatea imună existentă la cele două sexe: reactivitatea imună mai intensă la femei decât la bărbaţi, o mai mare susceptibilitate a femeilor la bolile autoimune, un prag mai crescut al nivelului seric al imunoglobulinelor, o mai mare rezistenţă la infecţiile bacteriene şi virale etc.

Receptorii pentru hormoni şi autacoizi (hormoni care acţionează numai la locul sintezei lor) sunt prezenţi la nivelul diferitelor celule în număr variabil, de la câteva sute până la câteva zeci de mii, efectul lor funcţional depinzând de tipul de celulă şi de natura semnalului transmis prin interacţia hormon-receptor. De regulă, prezenţa unor receptori pentru un anumit hormon la nivelul unor celule sau ţesuturi este un indiciu sigur că acel ţesut este sensibil la acţiunea hormonului respectiv.

## RECEPTORI PENTRU LECTINE

Recunoaşterea hidraţilor de carbon de către proteine este esenţială în diverse procese biologice. De pildă, este bine cunoscut faptul că infecţia virală poate avea loc numai în condiţia în care acidul sialic este recunoscut de către proteinele particulei infectante. Proteinele care leagă zaharurile ar avea situsuri sub formă de scobituri în moleculă, la nivelul cărora s-ar fixa reziduul carbo-hidraţilor (fig. 138 A).

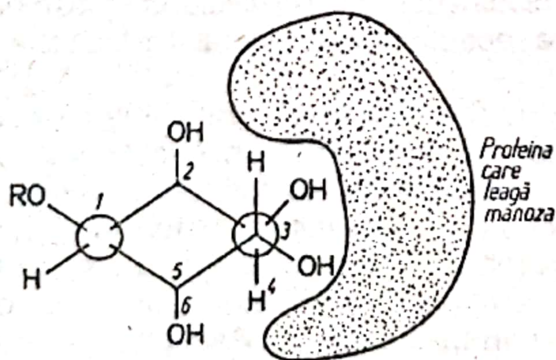



Fig.138 A. Interacţia unei proteine cu un hidrat de carbon (după Y.C.Lee).

Este bine cunoscut faptul că la nivelul membranei plasmatice a celulelor există hidraţi de carbon diferiţi, ataşaţi la rândul lor la proteinele sau lipidele din componenţa acestora. La aceştia, se leagă printre altele şi diferite lectine, de mare interes practic fiind cele de origine vegetală. La aceste lectine, afinitatea de legare este situată între $10^5$-$10^6$ $M^{-1}$, fiind de regulă mai mare pentru oligozaharide decât pentru monozaharide. Tabelul 87 exemplifică unele lectine şi hidraţi de carbon care interacţionează. Hidraţii de carbon pot exista sub formă de complexe – glicoproteine sau lipoproteine – în diferite

modalităţi de asociere moleculară. De exemplu, PHA (fitohemaglutinina), un mitogen vegetal, se leagă la galactoză. Această legare poate avea loc la nivelul lanţurilor polipeptidice care conţin galactoză, cum ar fi de pildă un lanţ de 20 kD care are manoză şi galactoză şi care este exprimat pe membrana plasmatică a limfocitelor *T*. În general, hidraţii de carbon sunt distribuiţi la nivelul diferitelor clase şi subclase de limfocite *T*, *B* etc., legarea lectinelor la membrana acestora prin intermediul lor provocând aglutinarea sau multiplicarea celulei, proces biologic cunoscut şi sub denumirea de "transformare blastică".

Maniera de legare a lectinelor la membrana plasmatică diferă nu numai de cea existentă în cazul antigenelor şi superantigenelor, dar şi de modalităţile existente în legarea diferitelor specii moleculare lectinice ( fig. 138 B).

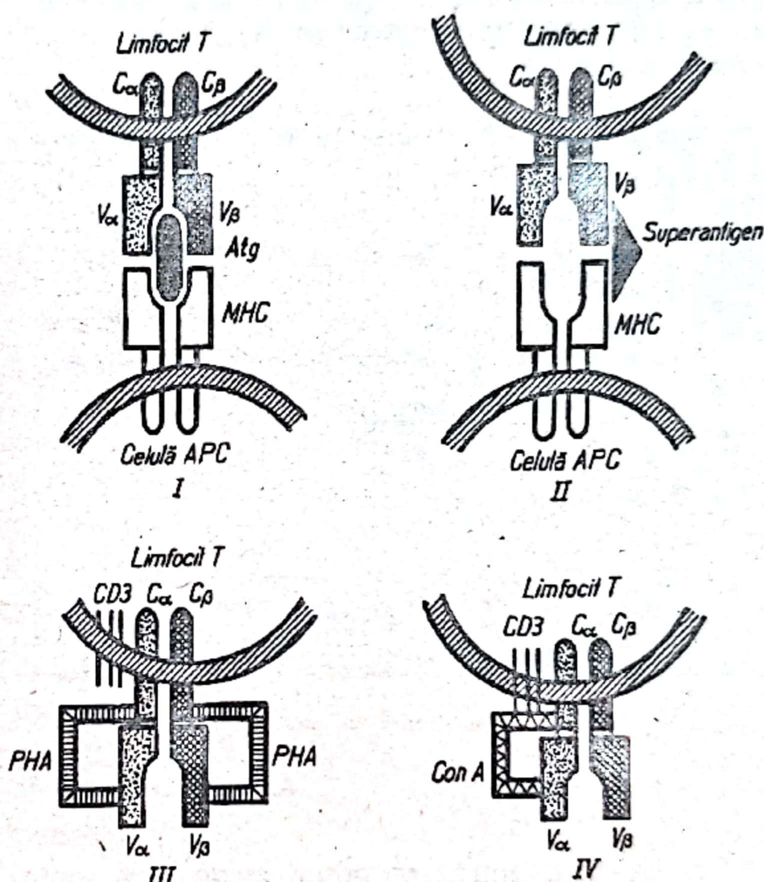



Fig. 138 B. Diferite modalităţi de legare a antigenelor, superantigenelor şi lectinelor la membrana plasmatică a limfocitului *T*.

I. Antigenul este recunoscut, sub restricţie MHC, de către nişa formată de domeniile variabile V$\alpha$ şi V$\beta$ ale TCR.

II. Superantigenele se fixează numai la V$\beta$ de către TCR şi la antigenele MHC de pe APC.

III. PHA este recunoscută de către domeniile constante (C$\alpha$, C$\beta$) şi variabile (V$\alpha$, V$\beta$) ale heterodimerului $\alpha\beta$, dar nu de $CD_3$.

IV. ConA este recunoscută de hidraţii de carbon de la nivelul domeniilor constante şi variabile ale lanţului $\alpha$ şi de $CD_3$ (după F. Licastro şi col.).

*Tabelul 87*

**Hidraţi de carbon recunoscuţi de către unele lectine vegetale**

| Sursa lectinei | Denumirea | Simbol | Hidratul de carbon la care se leagă |
|---|---|---|---|
| *Canavalia ensiformis* | Concanavalina A | ConA | $\alpha$ - D - manoză |
| | | | $\alpha$ - D - glucoză |
| *Phaseolus vulgaris* | Phytohemagglutinin | PHA | D - galactoză NAc |
| *Lens culinaris* | Lentil | LCA | $\alpha$ - D - manoză |
| | | | $\alpha$ - D - glucoză |
| *Arachis hypogea* | Peanut agglutinin | PNA | Galactoză |

Sunt două momente diferite în relaţia lectină-celulă: a) un moment de inducţie care duce celula de la faza $G_0$ la faza $G_1$ şi b) un moment de angajare care duce celula de la faza $G_1$ la faza S. Pentru realizarea fazei de inducţie, celula necesită un semnal de la lectină şi alt semnal, accesoriu, care de regulă, în cazul limfocitelor *T* în special, este dat de IL-1.

De regulă, celulele şi în special limfocitele *T* au receptori pentru diferite lectine, iar mai multe subpopulaţii celulare pot avea receptori pentru aceeaşi lectină. De pildă, limfocitele *T* au receptori pentru PHA, indiferent dacă sunt *T* activatoare, supresoare, etc. *In vitro*, în contact cu PHA se vor multiplica, celulele trecând prin faza de "blast" (fig.139), proces cunoscut sub denumirea de "activare policlonală", spre deosebire de stimularea antigenică unde este interesată numai clona care are receptori pentru antigenul respectiv şi un mare număr de clone ca în cazul stimulării lectinice.




Fig.139. Limfocit T "transformat blastic" (1) şi normal (2). Se observă diferenţa de volum dintre cele două celule.

## ALŢI RECEPTORI

Celulele au diferiţi alţi receptori, ca de pildă pentru TGF-$\beta$ (transforming growth factors = factori de creştere-transformare), EGR-R (factorul de creştere a epidermei), M-CSF sau GM-CSF (factorul de stimulare a cloniilor monocitare, respectiv granulocitar-monocitare), PDGF (factorul de creştere şi diferenţiere a trombocitelor), VIP (vasoactive intestinale peptide = peptida intestinală vasoactivă) etc.

De exemplu, pe trombocite, pe unele limfocite *T*, pe monocite şi macrofage, există receptori pentru TGF, un homodimer care poate exista sub formă de două peptide distincte, TGF-$\alpha$ şi TGF-$\beta$, dar cu activitate biologică unică. Pe monocite şi macrofage receptorul pentru TGF este slab exprimat, din care cauză susceptibilitatea acestor celule este relativ scăzută faţă de TGF. Acest factor provoacă agregarea trombocitelor, activează monocitele în vederea eliberării de mediatori cu rol în inflamaţii, stimulează proliferarea fibroblastelor, a angiogenezei etc.

M-CSF este un homodimer glicozilat cu acţiune pleiotropică asupra fagocitelor mononucleare pentru care monocitele exprimă cca. 50 000 receptori / celulă prin intermediul cărora primeşte semnale de la CSF-1 care le controlează proliferarea, diferenţierea, viabilitatea, activitatea tumoricidă şi producţia de alte citokine.

Receptorul pentru PDGF se poate autofosforila, funcţia lui fiind însoţită de activităţi protein-tirozin-kinazice cu fosforilarea fosfatidilinozitolului şi activarea mecanismelor biochimice intracitoplasmatice. Exemplele ar putea continua. Pe baza caracteristicilor structurale şi a secvenţei aminoacizilor, receptorii au fost încadraţi în mai multe subclase (v. fig. 128). Desigur, această tentativă de "clasificare" are o valoare limitată, deoarece nici numărul lor şi nici toate specificităţile de legare nu sunt cunoscute încă. Ce este cunoscut, este faptul că ei există, că sunt nişte adevărate "antene", extrem de numeroase şi extrem de diversificate în recepţionarea mesajelor din afara celulei, demonstrând cât se poate de evident, prin simpla lor existenţă, complexitatea fantastică a funcţiilor celulare.

# SEMNALE ŞI MESAGERI LA NIVEL CELULAR

Activitatea metabolică a unei celule şi, implicit, a aglomerărilor de celule care formează ţesuturile, organele şi în final organismul în toată complexitatea sa este în fond expresia relaţiilor enzimă-substrat. Dacă ar fi să considerăm simplist procesele biologice care stau la baza vieţii, poate că definiţia cea mai apropiată de adevăr ar fi aceea că viaţa nu este altceva decât exprimarea în dinamică a relaţiilor enzimă-substrat aflate sub influenţa permanentă a diverşilor factori de mediu. O celulă, este în fond un bogat arsenal de enzime localizate la toate nivelurile ei: membrană, citosol, nucleu. Acestea se influenţează reciproc, se controlează, se condiţionează şi se autoregenerează, realizând, atunci când acţionează asupra substratului, aşa zisele "cascade biochimice" care încorporează sau eliberează energia necesară activităţii celulare, fie pentru exprimarea unor funcţii ale sale, fie pentru multiplicarea ei. De exemplu, celula angajată în răspunsul imun specific realizează modificări activatoare ale unor enzime multifuncţionale, care catalizează secvenţa de reacţii ce vor controla toată activitatea celulei, începând cu sinteza acizilor graşi şi a lipidelor de membrană, ca de pildă acetil-coenzima A, malonil-coenzima A şi diverse alte sintetaze şi terminând cu metabolismul acizilor nucleici, unde sunt implicate enzime ca dezoxiribonucleaze, ribonucleaze, reverstranscriptaze, timidinkinaze, uridinkinaze etc.

Ca durată de timp, exprimarea finală a relaţiilor enzimă-substrat variază foarte mult. De exemplu, degranularea mastocitelor sau a eozinofilelor stimulate de către ligand prin receptorii *Fcε* se realizează într-un interval de la câteva zecimi de secundă până la 1-2 minute, interval care începe cu legarea stimulatorului la receptor şi se sfârşeşte cu expulzarea granulelor. Stimularea granulocitelor PMN care provoacă "explozia respiratorie" urmată de generarea metaboliţilor de oxigen durează câteva minute, timp necesar activării NADPH-oxidazei legată la membrană în vederea reducerii oxigenului molecular ($O_2$) în superoxid anion ($O^-_2$). În schimb, sinteza unor molecule de proteină, ca de pildă sinteza de imunoglobuline, conversia lor de la o clasă la alta, sau multiplicarea celulară, necesită minute, ore sau chiar zile.

Dar, indiferent de durata de timp necesară manifestării biologice a fenomenelor, principiul fundamental care stă la baza regenerării lor la nivel celular este în linii mari identic:

a) stimularea celulei de către liganzi endogeni sau exogeni;

b) recepţionarea mesajelor prin intermediul receptorilor;

c) activarea unor enzime care, acţionând asupra substratului, vor declanşa reacţii metabolice în lanţ, cu urmări diferite asupra economiei şi funcţiilor celulelor respective.

În cazul sistemului imun, principalele celule implicate în iniţierea şi dezvoltarea reacţiilor imune sunt macrofagele şi limfocitele care, odată stimulate, comunică

între ele, sintetizând şi eliberând în acest scop citokinele, nişte glicoproteine cu greutate moleculară mică (7-80 kD), dar cu largi implicaţii biologice şi cu multe caracteristici similare hormonilor din sistemul endocrin. Pentru sinteza lor şi pentru exprimarea potenţialului funcţional al celulelor, sunt absolut necesare declanşarea reacţiilor metabolice şi implicarea enzimelor celulare. Nu este aici locul pentru descrierea sau chiar menţionarea tuturor enzimelor prezente la diferite nivele, urmând a fi menţionate doar unele cu rol fundamental în declanşarea unor "relee biochimice" care să genereze activarea limfocitelor şi exprimarea unor funcţii ale lor. În linii mari, acestea efectuează defosforilări prin care se realizează mobilizarea şi accelerarea transportului transmembranar al diferiţilor ioni, stimularea metabolismului fosfatidil inozitolilor (PI) etc. Fosfolipazele sunt responsabile de defosforilarea substratului, iar kinazele de fosforilarea lui. Astfel, fosforilarea-defosforilarea proteinelor catabolizate de enzime este un important mecanism de control al activităţii metabolice a tuturor tipurilor de celule. Toate aceste tipuri au un component ubicuitar - inozitolul - prezent în celulele vii într-o mare complexitate structurală şi funcţională. De exemplu, unii componenţi ai lui, cum ar fi glicozil - fosfatidil - inozitolul, asigură ancorarea unor glicoproteine la membrana celulară, alţii, ca inozitol-1, 4, 5, trifosfatul (IP3), acţionează ca mesageri secundari intracelulari în transferul semnalelor primite la receptori etc. La rândul lor, ca orice substrat, sunt controlaţi de enzime sau proteine, care hidrolizează, îi deplasează de la un nivel al celulei la altul, îi recompun în structuri moleculare iniţiale activării etc. De exemplu, citosolul celulelor eukariote conţine proteine care mediază transportul diferitelor clase de fosfolipide, dintre care unele au specificităţi pentru fosfatidil-colină, altele pentru fosfatidil-serină, fosfatidil-inozitol etc. Proteina de transfer a PI este implicată în metabolismul şi transferul acestuia de la nivelul membranei plasmatice în condiţiile menţinerii gradului de concentraţie intramembranară constant. Când un ligand se leagă la receptorii de membrană, PI sunt hidrolizaţi, moleculele rezultate din această hidroliză (IP3 şi DAG) acţionând ca mesageri secundari la nivel citoplasmatic.

**Fosfolipazele** sunt enzime larg răspândite, prezente practic la toate celulele prokariote şi eukariote, care catalizează hidroliza fosfolipidelor de membrană. În funcţie de modul de clivare a fosfolipidelor se cunosc fosfolipidele A1, A2, B, C şi D (PLA1, PLA2, PLB, PLC şi PLD). Dintre toate, de interes major pentru imunologie este PLA2, larg răspândită în natură, găsindu-se din abundenţă în pancreas, în veninul de şarpe, spermatozoizi etc. Este componenta antigenică majoră a veninului de albine şi reprezintă unul dintre cele mai bine definite antigene care joacă rol în declanşarea bolilor alergice. Acţionează asupra fosfolipidelor şi eliberează acidul arahidonic (AA), calea ciclooxigenazică convertind AA în tromboxan A2 (TxA2), un potent inductor al agregării trombocitelor şi al contracţiei vasculare. PLC acţionează asupra fosfolipizilor inozitolici, degradarea inozitolfosfatului 2 (IP2) de către PLC generând IP3 şi DAG. La rândul său, DAG este hidrolizat în continuare de către diacilglicerollipază şi monoacetil-glicerol-lipază, redevenind AA.

PLA2 cu greutatea moleculară de cca. 15 kD, are multe legături disulfidice, este foarte stabilă la *p*H acid şi la temperaturi crescute şi are mare afinitate pentru fosfolipidele agregate şi conjugate. Este o enzimă asociată membranei plasmatice care catalizează hidroliza unui ester-acil legat la glicerofosfolipide, producând acizi graşi liberi şi lizofosfolipide. Pentru exprimarea activităţii sale necesită prezenţa $Ca^{2+}$. Această enzimă joacă un rol important în patogeneza pancreatitei acute, serul pacienţilor cu activitate crescută a PLA2 corelând cu necroza pancreatică severă. De asemenea, se găseşte împreună cu PLC în cantităţi mari în

monocitele şi macrofagele pacienţilor cu artrită reumatoidă, în boli cardiace, în şoc endotoxic, unde participă la instalarea colapsului circulator, în ischemia intestinală, boli nervoase, boli ale pielii cum ar fi leziunile psoriazice etc. PLA2 participă la generarea proceselor inflamatorii.

*Lipocortinele*, o familie de proteine anti-inflamatorii, printre care forma predominantă, de 35-40 kD, inhibă activitatea PLA2 prevenind formarea de mediatori ai inflamaţiei ca prostaglandine (PG) şi leucotriene (LT). Glucocorticoizii induc formarea lipocortinelor care, inhibând formarea PLA2, scad până la anulare eliberarea AA din lipidele de membrană. În serul pacienţilor cu artrită reumatoidă există anticorpi antilipomodulină care, blocând efectul acestei proteine din familia lipocortinelor, măresc activitatea PLA2. Totuşi, proteinele din familia lipocortinelor sunt prezente în concentraţie mare în multe celule, aşa că nu este sigur dacă ele sunt induse de glucocorticoizi sau sunt inhibitori ai PLA2. De aici ideea că glucocorticoizii ar acţiona prin alte mecanisme încă necunoscute, distincte de cele care ar consta din simpla lor legare la enzime. PLA2 mai este inhibată de vitamina E, care acţionează ca un anti-oxidant al lipidelor de membrană, de uteroglobulină, o proteină sintetizată de epiteliul endometrului şi celulele secretoare ale oviductului şi, probabil, şi de către vitamina C. Calciul ionic activează hidroliza fosfolipidelor de către PLA2 iar IL-1 şi TNF îi activează potenţialul enzimatic, de unde concluzia că reacţiile inflamatorii induse de IL-1 s-ar realiza prin activarea acestei enzime, mai exact prin activarea II PLA2 din zonele de inflamaţie şi nu al PLA2 pancreatică. La nivelul limfocitelor şi probabil şi al altor celule, PLA2 este complexată cu lipocortina, inhibitorul ei natural. PKC, odată activată, desface complexul lipocortină - PLA2 eliberând enzima care, în prezenţa nivelului crescut de $Ca^{2+}$ citosolic se activează scindând fosfolipidele de membrană în lipofosfolipide şi acid arahidonic (fig. 140).

**Proteinkinazele** sunt enzime ubicuitare responsabile de fosforilarea proteinelor, proces cu largi implicaţii în proliferarea celulară, dereglarea fosforilării ducând adesea la transformarea neoplazică a celulei. De aceea, fosforilarea poate fi considerată ca un marker al transformării celulare. Această familie de enzime poate fosforila proteinele la nivelul tirozinei, serinei sau treoninei (tirozin-kinaza, serin-kinaza sau treonin-kinaza), rol important din acest punct de vedere avându-l PKC, care conţine cel puţin 7 izoenzime diferite (tabelul 88), constituind un adevărat pivot în reglarea funcţiilor celulelor şi transducerea semnalelor de la membrană spre nucleu. Activarea PKC poate induce modificări în conformaţia sau distribuţia actinelor limfocitare. De asemenea, această enzimă este potenţial funcţională atunci când este legată la lipidele anionice ale membranei ca de pildă fosfatidil-serina (PTS), cardiolipina, $PIP_2$ şi acidul fosfatidic (APh) care acţionează ca un receptor al ei. Este activată fiziologic de DAG generat de PI membranar şi constituie principalul receptor intracelular al forbol esterilor. Enzima are un domeniu catalitic COOH terminal de 50 kD, care interacţionează cu ATP şi proteina substrat, şi un domeniu $NH_2$ terminal de 32 kD care recepţionează mesajele de la $Ca^{2+}$, lipide şi forbol esteri.

Sfingozina, staurosporina, 1-(5-isoquincilinilsulfonil)-2-metil piperazina, îi inhibă activitatea, fiind blocanţi ai multiplicării celulelor, iar acizii graşi nesaturaţi şi în special acidul oleic sunt activatori care, spre deosebire de DAG şi PTS nu necesită prezenţa $Ca^{2+}$. În afară de rolul ei în transducerea semnalelor şi sinteza proteinelor PKC, prin fosforilarea tirozinhidrolazei, mediază efectele factorilor de creştere a neuronilor (NGF), fiind de fapt un mesager secund pentru NGF. Tot ea asigură mobilitatea spermatozoizilor. Fosforilarea tirozinelor este necesară pentru transducerea semnalelor. Dereglarea tirozinkinazelor poate influenţa proliferarea

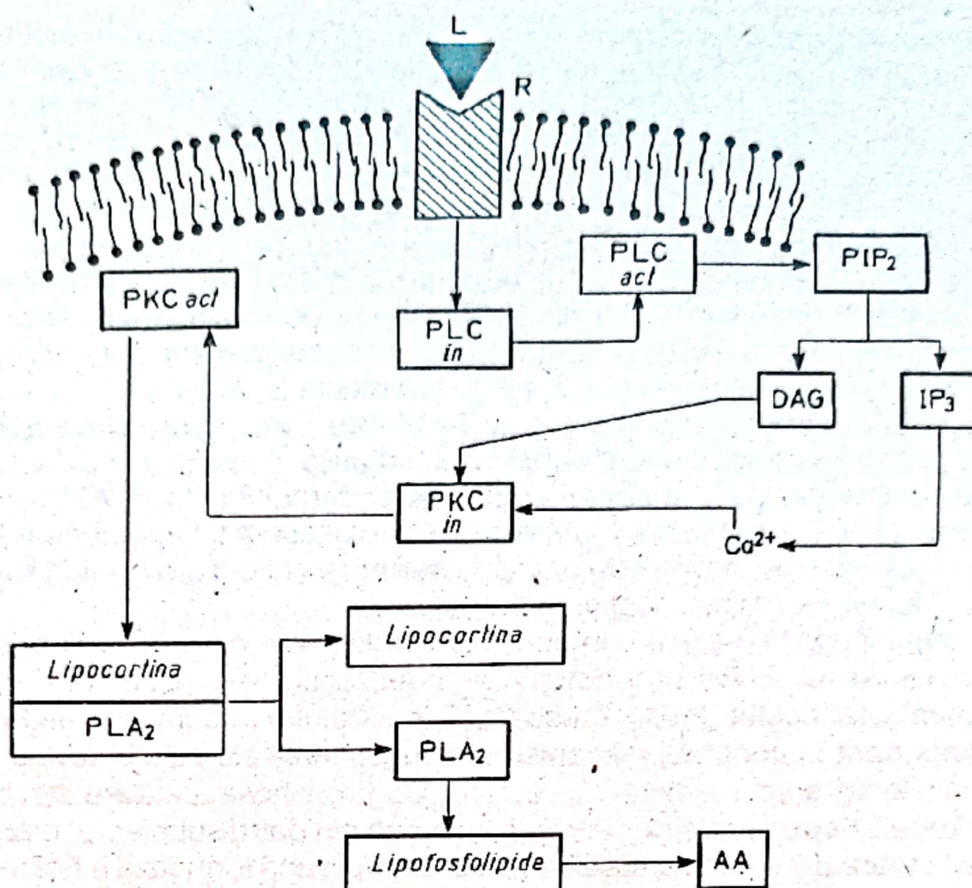



Fig.140. Relee biochimice care duc la activarea PLA2 consecutiv stimulilor transmişi de la nivelul receptorilor (R) de către ligand (L) (după E. Kaiser şi col.).

$PLC_{in}$ = fosfolipaza C inactivă; $PLC_{act}$ = fosfolipaza C activată; $PIP_2$ = fosfatidil-inozitol-difosfat; $IP_3$ = inozitol-trifosfat; DAG = diacil-glicerol; $PKC_{in}$ = protein-kinaza C inactivă; $PKC_{act}$ = protein-kinaza C activată; $PLA_2$ = fosfolipaza $A_2$; AA = acidul arahidonic.

celulară, unele enzime care participă la transducerea semnalelor, ca de exemplu PLC, putând fi substrat pentru receptorii tirozinkinazici. Deci, proteinkinazele joacă un rol fundamental în transducţia semnalelor care reglează creşterea, diferenţierea şi răspunsul celulei la diverse semnale venite din exterior.

*Tabelul 88*

**Subspeciile de PKC prezente în ţesuturile mamiferelor (după Y. Nishizuka)**

| Caracteristica | Subspecia | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\alpha$ | $\beta_1$ | $\beta_2$ | $\gamma$ | $\delta$ | $\varepsilon$ | $\zeta$ |
| Numărul reziduurilor de aminoacizi | 672 | 671 | 673 | 697 | 673 | 737 | 592 |
| Greutate moleculară (kD) | 76,80 | 76,79 | 76,90 | 78,40 | 77,50 | 83,50 | 67,70 |
| Localizare pe cromozomul uman nr. | 17 | 16 | 16 | 18 | ? | ? | ? |

**Adenilat- şi guanilat-ciclazele** sunt enzime care catalizează adenin-fosfaţii, respectiv guanidin-fosfaţii implicaţi în multiple funcţii celulare. Aceşti nucleotizi pot modifica concentraţia intracelulară a unor ioni, ca de pildă $Ca^{2+}$ sau $Mg^{2+}$, pot schimba permeabilizarea membranei plasmatice, stimula sau inhiba proliferarea celulară sau sinteza unor proteine etc. De exemplu, ATP induce modificări în fluxul $Ca^{2+}$ şi $Mg^{2+}$ în timocite fără a fi implicată şi PLC, permeabilizează membrana timocitelor, deschide porii membranari etc. ATP intracelular este o importantă sursă de energie pentru celulă, nucleotidul rămânând de regulă în interiorul acesteia. Totuşi, unele celule îl pot elimina iar acesta, odată ajuns în exterior, poate influenţa multe procese biologice ale trombocitelor, monocitelor, mastocitelor sau limfocitelor, acţionând în special prin cele două mecanisme amintite: modificarea permeabilităţii membranei celulare şi a fluxului transmembranar de ioni. Sub acţiunea fosfatazelor şi kinazelor se poate realiza ciclul ATP-ADP-cAMP cu eliberare de energie şi cu impact asupra metabolismului celular. ATP-azele, de exemplu, sunt enzime celulare intrinsece care folosesc ATP ca substrat sau ca sursă de energie, fiind activate de unul sau mai mulţi cationi ca de pildă $Na^{+}$, $K^{+}$, $Ca^{2+}$, $H^{+}$, şi, poate, şi de anioni cum ar fi $Cl^{-}$.

În multe cazuri, ATP-azele sunt maşinării moleculare care controlează transportul ionilor. Astfel, ATP şi probabil şi ADP induc blastogeneza timocitelor tratate cu forbol-miristat-acetat (PMA), cresc $Ca^{2+}$ intracelular fără implicarea PLC etc. Un rol important în controlul mecanismelor funcţionale ale celulei revine cAMP, ale cărui efecte sunt mediate de fosforilarea proteinelor celulare de către o protein-kinază dependentă de cAMP şi compusă din patru substanţe, dintre care două reglatoare (R) şi două catalitice (C), care împreună formează o holoenzimă. cAMP emite semnale inhibitoare asupra unor funcţii celulare. În cantităţi mari, inhibă de exemplu proliferarea limfocitelor expuse stimulilor mitogenici *in vitro*, probabil ca urmare a inhibiţiei sintezei IL-1, IL-2 şi a receptorilor pentru IL-2.

Dar efectul cAMP nu este numai inhibitor; el depinde de starea de activare a celulei, motiv pentru care poate fi considerat mai mult imunomodulator decât inhibitor. De exemplu, limfocitele *T* h activate sintetizează IL-2, IFN-$\gamma$ şi limfotoxine. În cantităţi mai modeste, sintetizează IL-4 şi IL-5. Sinteza acestora este condiţionată de gradul de activare a celulei. La stimuli puternici, care ocolesc receptorul pentru antigen de pe limfocitul *T* (TCR), sunt sintetizate atât IL-2 cât şi IL-4 dar, o dată cu creşterea nivelului cAMP, sinteza IL-2 este blocată fără modificarea sintezei IL-4. În caz de nivel celular scăzut al cAMP, efectul este diametral opus. Efectele ATP şi ale derivaţilor săi sunt influenţate antagonist de către GTP şi derivaţii săi, care realizează sub controlul guanidinciclazelor ciclul GTP-GDP-cGMP.

Deci, scindarea GTP sau ATP de către GTP-ază sau ATP-ază joacă un rol important în controlul energetic şi biochimic al celulei, ele acţionând antagonist. Astfel, GTP stimulează exocitoza granulelor mastocitelor, iar ATP o inhibă, ATP-aza fiind considerată ca o maşinărie a transportului transmembranar al $Na^{+}$ şi eventual şi al $K^{+}$. GTP-azele au rol în controlul transmiterii semnalelor transmembranare, direcţionează sinteza şi translocarea proteinelor etc. Ar exista trei clase de GTP-aze: una cu greutatea moleculară de 21 kD, produsă de unele proto-oncogene, alta cu rol în sinteza unor proteine ribozomale şi alta, ca subunităţi $\alpha$ ale proteinelor G. Pentru a efectua multiplele funcţii celulare, toate GTP-azele trec prin acelaşi ciclu unidirecţional în care hidroliza GTP şi conversia GDP-GTP au un rol major. Cheia funcţiei celulare a GTP-azelor este modificarea afinităţii GTP pentru macromolecule ca de pildă lanţurile $\alpha$ ale proteinelor G.

**Proteinele G** (proteine care leagă nucleotidul guanină) sunt componente ale sistemelor de transmitere transmembranară a semnalului la celulele eukariote, responsabile de transportul informaţiei de la receptorii de membrană activaţi în urma contactului cu ligandul la efectorii intracelulari. Ele cuplează receptorii la moleculele efectoare intracelulare, o proteină G putând cupla mai mulţi receptori. Unii receptori, ca de pildă cei pentru hormoni sau neurotransmiţători, sunt cuplaţi prin proteine G la diferiţi efectori cum ar fi unele fosfolipaze, fosfodiesteraze, adenilciclaze sau canale ionice. Proteinele G sunt heterodimeri compuşi din subunităţile $\alpha$ (39-52 kD), $\beta$ (35-36 kD) şi $\gamma$ (8-10 kD) care se leagă specific şi hidrolizează nucleotizii guanidină, cu referire specială la GTP. Ele funcţionează printr-un ciclu de disociere a subunităţilor $\alpha\beta\gamma$ care este corelat cu un ciclu de schimbări survenite în conexiunea receptor-nucleotid (GDP sau GTP). Astfel, un complex specific agonist-receptor catalizează schimbări între GDP legată la subunitatea $\alpha$ şi GTP. Complexul GTP se disociază de $\beta\gamma$ şi interacţionează cu efectorul respectiv. Deci, subunitatea $\alpha$ leagă şi hidrolizează GTP, iar subunităţile $\beta\gamma$, mai bine conservate, servesc la ataşarea proteinei G la suprafaţa citosolică a membranei şi la prezentarea lanţului $\alpha$, receptorului. Energia rezultată din legarea şi hidroliza GTP este utilizată de proteina G pentru cuplarea receptorului de membrană la efectorii celulari (fig. 141).

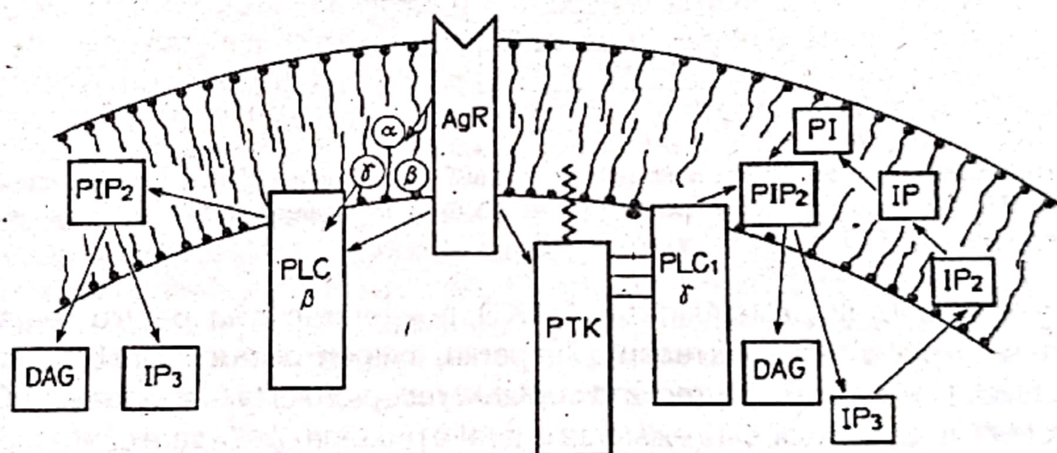



Fig.141. Activarea inozitol-fosfaţilor ($PIP_2$, $IP_3$, $IP_2$, IP, PI) în relaţia receptor pentru antigen (AgR)-protein kinaze (PTK)- fosfolipaze (PLC-g1)-proteine G (după M. Harnett şi K. Rigley).

Subfamilia de proteine G are cel puţin cinci membri: Gs, Gi, Go, Gt şi Gz, toţi formaţi din subunităţi $\alpha\beta\gamma$ şi potenţi în transducerea semnalelor pe calea receptor-proteină G-efector. Gs şi Gi sunt mediatori ai stimulării sau inhibiţiei adenilat ciclazei, Go este o proteină abundentă în creier care reglează canalele de $Ca^{2+}$, Gt sau "transductina" este predominantă în retină, iar Gz necunoscută încă sub raport funcţional. Semnalele transduse de către ele ar fi implicate în activarea PLC, PLA2, unele dintre ele putând acţiona ca mesageri secundari datorită efectelor lor directe asupra canalelor ionice. Această mare subfamilie, extrem de diversificată structural, implicată în reglarea evenimentelor celulare (semnalizare transmembranară, transcripţie, proliferare şi diferenţiere), poate fi împărţită, pe baza comportării faţă de toxina pertussis, în două clase majore: a) molecule sensibile la toxină (Gi, Go) şi b) rezistente la toxină (Gs, Gz).

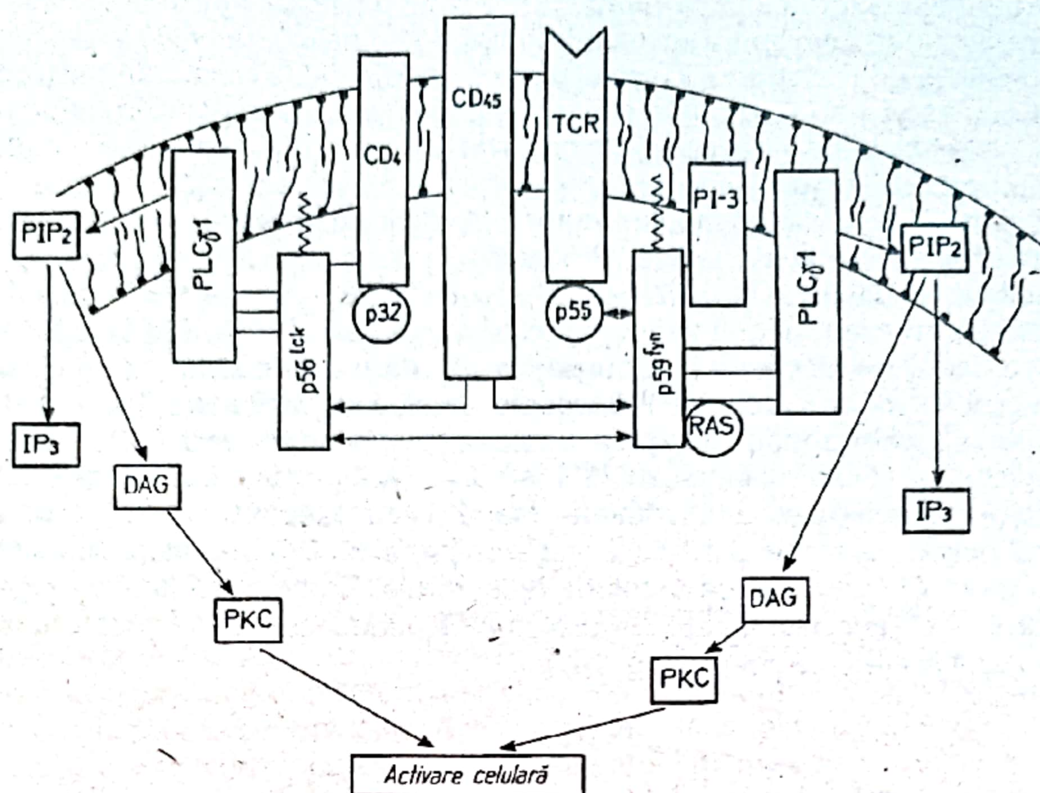



Fig.142. Evenimente activatoare la nivelul limfocitului T consecutiv angajării receptorului pentru antigen (TCR) şi a altor molecule accesorii (CD4, CD45) cu implicarea proteinelor G şi protein-kinazelor (după M.Harnett şi K. Rigley).

Proteinele G şi proteinkinazele (PKT) pot interacţiona pentru reglarea semnalizării prin intermediul receptorilor pentru antigen, al proceselor biochimice de la nivelul celulelor *B* şi *T*, reglând cuplarea receptorului la fosfolipaze (PLC).

Recent, a fost descoperită existenţa unei alte proteine - p55 - care este asociată receptorului pentru antigen de la nivelul limfocitului *T* şi care ar media legătura dintre acesta şi protein-tirozin-fosfataza $p59^{fyn}$, acţionând sinergic cu CD45 (fig. 142).

Procesele exacte care au loc în activarea celulară şi rolul proteinelor G sunt încă insuficient cunoscute. S-a emis ipoteza că la celula în repaus receptorii sunt distanţaţi de proteina G, apropierea lor realizându-se numai după stimularea receptorului de către ligand. O altă ipoteză susţine că receptorul şi proteina G sunt "precuplaţi", formând un complex, care poate interacţiona cu subunitatea catalitică a adenilat-ciclazei) numai după ce hormonul s-a fixat la cuplu. Şi într-un caz şi în celălalt, formarea complexului receptor-proteină G-efector (de exemplu, adenilat-ciclaza) este absolut necesară pentru activarea proteinelor G şi transmiterea semnalelor. Aceste proteine au fost implicate, în cazul limfocitelor *T*, în reglarea fosfatidil-inozitolului (PI), fosfatidil-inozitol-colinei, PLC, PLD, PLA2 şi altor amine, fără a se cunoaşte precis dacă ele au vreun rol în activarea PKC. Nu este exclus ca receptorii de membrană, după contactul cu ligandul, să activeze aceste proteine şi pe alte căi, la care ar participa eventual şi tubulina din citoscheletul celulei, un heterodimer cu greutatea moleculară de 110 kD.

## SEMNALE BIOCHIMICE INTRACELULARE

Orice compus chimic, care se poate fixa la receptorii de la nivelul membranei, citoplasmei sau nucleului, se numeşte "ligand". Liganzii pot fi molecule de proteine sau glicoproteine recunoscuţi specific ca antigene de către limfocitele *T* sau *B*, molecule de enzimă, lectine, hormoni etc. În linii generale, impactul ligandului cu receptorii de la nivelul membranei plasmatice, de exemplu, este urmat de generarea unor semnale şi transmiterea de informaţii către nucleu, efectul final fiind modificarea "status-quo"-ului celular, în sensul activării sau inhibării unor funcţii ale acesteia.

Generarea acestor "mesageri secundari" provoacă activarea factorilor transcripţionali cu recunoaşterea următoarelor etape distincte:

a) recepţionarea mesajului la nivelul receptorului;

b) transmiterea informaţiilor la nivelul membranei şi citoplasmei, care include, în cazul stimulării antigenice a limfocitelor de exemplu, hidroliza IP, activarea PKC, redistribuirea $Ca^{2+}$ în citosol, influxul de $Ca^{2+}$, creşterea activităţii tirozin-kinazice, respectiv fosforilarea proteinelor;

c) declanşarea evenimentelor nucleare care vor modifica starea nucleului, activând mitoza celulară sau sinteza unor proteine.

Deci, legarea la receptor este un proces iniţial obligatoriu care declanşează diferite evenimente la nivel membranar, exprimate prin activarea fosforilării proteinelor şi în general a funcţiilor enzimatice, modificarea transportului şi a activităţii metabolice provocând schimbări caracteristice în organizarea citoscheletului şi, implicit, în morfologia şi biologia celulei. Hormonii steroizi şi tiroidieni, de exemplu, traversează uşor membrana plasmatică pentru a ajunge în celulă, unde se leagă la receptori care, la rândul lor, se vor fixa la nivelul ADN-ului. Legarea hormonului la receptor activează translocarea acestuia spre nucleu, unde se leagă de elementul de control al ADN şi activează transcripţia genică. În cazul altor liganzi, inclusiv al hormonilor slab difuzibili, activarea transcripţiei genice se face indirect, prin legarea liganzilor peptidici la receptorii de pe membrană, proces care activează formarea de mesageri intracelulari secunzi de genul cAMP, DAG, IP, $Ca^{2+}$ etc. Practic, sunt două căi mai importante de transducţie a semnalului în controlul transcripţiei genei: a) o cale care duce la activarea PKA, dependentă de cAMP şi b) o cale care duce la activarea PKC, dependentă de cGMP.

Pentru realizarea acestor etape, receptorii de membrană, indiferent de specificitatea lor pentru ligand, sunt alcătuiţi din trei domenii distincte, şi anume, din domeniul extracelular specializat în recunoaşterea ligandului, continuat cu domeniul transmembranar, intracitoplasmatic (cu rol în transmiterea mesajelor primite de la exterior către interiorul celulei), care de regulă are o grupare COOH terminală. Acesta este cazul receptorilor pentru antigen de natură imunoglobulinică de pe suprafaţa limfocitelor *B*. Există însă şi situaţii în care, pentru transmiterea mesajelor, este necesară asocierea la receptorul propriu-zis a unor molecule accesorii, cum este cazul receptorului pentru antigen de pe limfocitul *T* sau al proteinelor *G* de la nivelul altor receptori. În afara receptorului şi componentelor transductoare, care pot face parte integrală din compoziţia lui sau pot fi sub formă de molecule asociate, mai intervin în releele de informare şi moleculele "efectoare" care transmit sau amplifică mesajul şi care, de regulă, sunt enzime de genul adenilat- sau guanilat-ciclazelor, fosfolipazelor etc. La celula în stare de repaus, receptorul este inactiv iar moleculele accesorii sunt implantate în membrana celulară ca unităţi independente şi eventual izolate unele de altele. Odată receptorul activat, se produc modificări în relaţia receptor-transductor-efector,

declanşându-se semnalul activator. Probabil există diferite mecanisme şi căi de transmitere a semnalului care intră în funcţie condiţionat de tipul de receptor care generează diferite transformări la nivel celular, ca de pildă modificarea microviscozităţii membranei, activarea enzimelor responsabile de procesele de fosforilare sau defosforilare, modificarea şi accelerarea transportului transmembranar al ionilor, stimularea metabolismului PI, reorganizarea citoscheletului etc.

Stimularea şi activarea funcţiilor celulare se poate face pe două direcţii majore de recepţionare şi transmitere a semnalelor: a) prin fosforilarea tirozin-kinazei şi b) prin hidroliza inozitol-fosfaţilor. Prima cale joacă un rol important în acţiunea unor factori de creştere cum ar fi factorul de creştere a epiteliilor (EGF), factorul de creştere derivat din trombocite (PDGF) etc., iar cea de a doua este implicată în mitoza celulară şi depinde de activarea PLC care va hidroliza IP2 şi va stimula PKC ca urmare a mobilizării $Ca^{2+}$. În cazul limfocitelor *B*, de exemplu, legarea încrucişată a receptorilor de membrană de natură imunoglobulinică (mlg) de către antigene sau anticorpi este primul act generator al cascadelor biochimice intracelulare. Dar, pentru ca celula să poată evolua spre plasmocit şi spre mitoză, este necesară şi intervenţia unor citokine şi chiar contacte intercelulare *T* - *B*. Astfel, după legarea mlg au loc în câteva sutimi de secundă fosforilarea reziduurilor de serină şi treonină din substratul membranei, activarea PLC prin legarea GTP şi hidroliza inozitolilor cu formarea de IP3 care mediază eliberarea de $Ca^{2+}$ din reticulul endoplasmatic şi formarea de DAG. După cca. 60 de secunde de la stimularea receptorilor, IP3 atinge nivelul intracelular maxim pentru ca ulterior, prin defosforilări secvenţiale, să fie convertit în IP2, IP1 şi IP. În decurs de 1-2 minute de la stimul, DAG mediază translocarea PKC din citosol către membrană, proces care însoţeşte activarea acestei enzime şi la care participă atât $Ca^{2+}$ cât şi fosfatidil-serina (PTS). Mulţi activatori ai PKC sunt şi promotori potenţiali ai devierilor neoplazice, de unde ideea că activarea acestei enzime poate fi şi un factor de iniţiere şi progresie a proliferării tumorale. Eliberarea $Ca^{2+}$ intracelular este urmată de un influx de $Ca^{2+}$ din exteriorul celulei, internalizare la care DAG şi forbol-esterii nu deţin rol important, acesta revenind inozitol-fosfatului 4 (IP4). Protein-kinaza C, după ce a activat sinteza proteinelor, este inhibată funcţional prin translocarea de la nivelul membranei către nucleu, proces indus de cAMP, IFN-$\gamma$ şi TGF-$\gamma$. Aceleaşi secvenţe biochimice au loc şi la nivelul limfocitului *T* : activarea de către antigen sau lectine, care constituie semnalul I, este asociată cu mobilizarea intracelulară a rezervelor de $Ca^{2+}$ şi apoi de deplasarea transmembranară a ionilor, evenimentul cel mai timpuriu începând cu efluxul de $K^{+}$ şi $H^{+}$, activarea $Ca^{2+}$ de la nivelul reticulului endoplasmatic şi apoi a influxului de $Ca^{2+}$ şi $Na^{+}$. Transducerea semnalului activează rapid hidroliza IP2 în IP3, responsabil cu mobilizarea $Ca^{2+}$ şi activarea PKC. Scăderea nivelului $Ca^{2+}$ intracelular activează prin IP3 calea de acces a $Ca^{2+}$ extracelular, astfel că se realizează menţinerea la nivel constant a concentraţiei intracelulare a ionilor de Ca în condiţiile existenţei unei active circulaţii intra- şi extracelular. Ca şi în cazul limfocitelor *B*, limfocitele *T* nu progresează spre ciclul mitotic decât după intervenţia semnalului II generat de IL-1 sau de derivaţii acil ai forbolului. Ambele semnale induc sinteza IL-2 şi exprimarea receptorilor pentru IL-2 la nivelul membranei plasmatice (fig. 143). Transformarea blastică a limfocitelor este însoţită de modificări în compoziţia lipidelor, ca de pildă creşterea proporţiei de acid oleic şi scăderea celei de acid linoleic urmate de modificarea proprietăţilor fizice ale membranei, asociate cu modularea proteinelor ei. Desigur, releele biochimice sunt mult mai complexe deoarece ele implică nu numai intervenţia altor ioni, ca de pildă $Mn^{2+}$, $Zn^{2+}$ etc., dar şi declanşarea mecanismelor de autoreglare



Fig.143. Căi metabolice de activare a celulei consecutiv hidrolizei inozitol-fosfaţilor. Fixarea ligandului (L) la receptor (R) activează transmiterea semnalelor de fosforilare (PO4) care vor activa fosolipaza C (PLC) şi o vor transmuta de la periferia membranei către interiorul ei. PLC hidrolizează inozitol-difosfatul (din cadrul ciclului inozitol-monofosfat -IPI-, inozitolfosfat şi inozitol) în inozitoltrifosfat (IP3) şi diacilglicerol (DAG). IP3 mobilizează $Ca^{2+}$ din reticulul endoplasmic (RE) care migrează în citosol, iar DAG mobilizează proteinkinaza C (PKC) către suprafaţa citoplasmatică a membranei celulare, mobilizare la care contribuie şi influxul de $Ca^{2+}$ extracelular, al cărui acces în celulă este activat de către inozitol tetrafosfat (IP4).

PKC fosforilează proteinele implicate în procesele biologice celulare, cum ar fi cele cu rol în sinteza IL-2 sau în exprimarea IL-2R. O parte din DAG se disociază în acid fosfatidic (APh), care blochează DAG nedisociat, întrerupând astfel efectul său activator asupra PKC.

Blocarea DAG se realizează şi prin activarea altor proteinkinaze (PK), sub acţiunea calmodulinei, a cărei sinteză este controlată şi de către IP3 şi care poate exercita efecte multiple asupra nucleului celulei. Una dintre primele modificări care au loc la nivelul membranei celulare după formarea complexului ligand-receptor este deschiderea canalelor pentru ioni şi asigurarea afluxului şi influxului acestora.

Procese similare pot fi induse şi de către unii activatori de genul forbol-miristat-acetat (PMA) sau ionoforului A23187 care acţionează direct asupra PKC ocolind metabolismul inozitolilor.

________ transformare sau activare;

-- -- -- -- -- transmutaţie;

x--x--x--x-- inhibiţie.

şi autocontrol cu activarea sau inhibarea reacţiilor care vor antrena alte enzime şi metaboliţi celulari. De exemplu, activarea PLA2 prin semnale primite de la unii hormoni modifică arhitectura dublului strat lipidic. Urmează sinteza acidului arahidonic din care, pe cale ciclo-oxigenazică se sintetizează prostaglandine stimulatoare ale adenilat-ciclazei care controlează sinteza cAMP. La rândul său, cAMP va inhiba proliferarea limfocitelor şi exprimarea, în cazul limfocitelor *T*, a receptorului E (CD2), blocând astfel receptorul pentru antigen al acestora şi posibilitatea de recepţionare a altor mesaje din exterior.

Pe scurt, în linii generale, ar fi următoarele căi posibile de transmitere a semnalelor activatoare sau inhibitoare:

a) Activarea enzimelor responsabile de procese de fosforilare (kinaze) sau defosforilare (fosfolipaze);
b) Mobilizarea $Ca^{2+}$ intra- şi extracelular;
c) Modificări în organizarea citoscheletului;
d) Schimbări la nivelul nucleotizilor ciclici.

**Activarea enzimelor** implică tirozinkinazele şi fosfolipazele, în special cu translocări de la nivelul citoplasmei către membrană (în caz de activare funcţională), sau de la nivelul membranei către nucleu (în caz de inhibiţie). Translocările pot fi declanşate de stimuli antigenici sau mitogenici primiţi prin receptorii de membrană sau de forboli-esteri care vor declanşa hidroliza inozitol-fosfaţilor, cu consecinţele ilustrate anterior. Un mare număr de receptori induc alterări conformaţionale şi modificări funcţionale ale adenilat-ciclazei (ACy), o altă enzimă cu rol major în modularea funcţiilor celulare. În cazul ei, forbol-esterii cresc, scad sau nu au nici un efect asupra potenţialului său funcţional, fapt care permite speculaţia că modularea ACy poate juca un rol important în reglarea proliferării limfocitelor. Astfel $PGE_2$ activează ACy care, la rândul ei, va modula răspunsul celular prin intermediul metaboliţilor ciclului acidului arahidonic (AA) şi al nucleotizilor ciclici. Creşterea pragului intracelular al cAMP şi scăderea nivelului oGMP ar putea avea efecte inhibitoare, în timp ce scăderea cAMP şi creşterea oGMP ar activa unele funcţii celulare. De exemplu, $PGE_2$ inhibă sinteza IL-2 responsabilă, atunci când se găseşte în concentraţii optime, de translocare spre membrana plasmatică şi de fosforilarea substraturilor membranare. Prin modularea adenilatciclazei, $PGE_2$ stimulează hidroliza ATP şi formarea cAMP cu efect inhibitor asupra proliferării limfocitare. Adenilat-ciclaza nu este însă modulată numai de $PGE_2$ sau IL-2. Se pare că activitatea ei ar fi controlată şi de alte complexe proteice, ca de pildă TPA (12-0-tetradecanoil-forbol-B-acetat) care ar acţiona într-o manieră similară IL-2, adică prin stimularea PKC, ajungându-se la inhibiţia ACy datorită fosforilării reversibile a unor componente ale acesteia.

Din punct de vedere funcţional există posibilitatea intervenţiei a două clase distincte de receptori: una care induce transformări la nivelul inozitolilor, urmate de mobilizarea $Ca^{2+}$, de activarea translocării PKC, de sinteza de limfokine şi de exprimarea de receptori pentru acestea, şi alta, care stimulează PLA realizând, prin derivaţii AA, respectiv prin $PGE_2$, activarea ACy şi creşterea nivelului cAMP cu efect inhibitor asupra unor funcţii celulare. Desigur, aceste căi metabolice sunt departe de a fi unice iar procesele menţionate mai sus nu sunt chiar atât de simpliste. Intervin o mulţime de factori, dintre care unii probabil că sunt încă necunoscuţi. De exemplu, pe lângă proteinkinaze, adenilat-ciclaze, fosfolipaze etc., un rol important în activarea funcţiilor celulare consecutiv interacţiilor receptor-ligand ar reveni transglutaminazei, o enzimă situată intracelular şi care este activată numai în condiţia creşterii pragului de $Ca^{2+}$, creştere care, după cum s-a subliniat, are loc în urma stimulării celulei consecutiv legării încrucişate a

receptorilor şi activării inozitol-fosfaţilor. Activitatea transglutaminazei creşte foarte mult în primele 10-30 de minute de la stimularea limfocitelor *T* cu activatori policlonali de genul PHA sau ConA în prezenţa ionilor de $Ca^{2+}$. Probabil că declanşarea rapidă a influxului de $Ca^{2+}$ imediat după stimularea limfocitelor este impusă şi de necesitatea de activare a acestei enzime care, odată activată, se va lega la complexul receptor-ligand prin lanţuri $\varepsilon(\gamma$-glutamil)-lizină, facilitând endocitoza complexului şi declanşarea reacţiilor biochimice intracelulare.

**Mobilizarea $Ca^{2+}$.** Creşterea intracelulară a $Ca^{2+}$ activează nu numai transglutaminaza dar şi alte enzime citoplasmatice cu rol în sinteza proteinelor şi în mitoza celulară. Se pare că modificările de la nivelul fosfatidil-inozitolilor, instalate imediat după primirea semnalelor de la complexul ligand-receptor, constituie impulsul primar major care declanşează deschiderea canalelor şi cascada de reacţii biochimice intracelulare. Deschiderea acestora permite atât accesul ionilor din afară în interiorul celulei, cu condiţia ca în exterior concentraţia lor să nu fie mai mică de $3x10^{-6}$ M, cât şi efluxul unor ioni din celulă în afara ei. Viteza de deschidere a canalelor şi durata de captare a $Ca^{2+}$ sunt condiţionate atât de specie cât şi de tipul celulei implicate. Astfel, limfocitele umane îşi menţin deschise canalele timp de cca. 20-24 de ore de la stimularea *in vitro* cu PHA, pe când cele murine, le menţin deschise cca. un minut. Această perioadă de timp corespunde perioadelor în care este necesară prezenţa unui prag crescut de $Ca^{2+}$ intracelular.

Probabil că, datorită acestui fenomen, momentul maxim al încorporării de timidină tritiată ($^3$H-Td) şi deci al sintezei de ADN de către limfocitele *T* umane stimulate cu PHA este de 72 de ore iar al celor murine, de numai 36 de ore. În cazul stimulării cu ConA, captarea de $Ca^{2+}$ de către limfocitele umane atinge nivelul maxim în decurs de 1-2 ore. Pe lângă influxul de $Ca^{2+}$, are loc şi influxul de $Na^+$, concomitent cu efluxul de $K^+$ şi $H^+$. Spre deosebire de lectine, care mobilizează $Ca^{2+}$ şi provoacă afluxul acestuia în celulă, IL-2 nu induce astfel de modificări. La nivelul neutrofilelor, stimulul recepţionat la suprafaţa membranei este urmat de dislocarea $Ca^{2+}$ din depozitul membranar către citosol şi deschiderea canalelor care, în final, activează diverse enzime şi induc profunde modificări la nivelul actinelor şi implicit ale citoscheletului şi formei celulei.

**Modificări la nivelul citoscheletului.** Mobilizarea ionilor de $Ca^{2+}$, ca urmare a semnalelor primite de la complexul ligand-receptor, provoacă schimbări în distribuţia actinelor şi alterări în organizarea sistemului microfilamental.

**Modularea metabolică a nucleotizilor ciclici.** La majoritatea celulelor activate, un rol important revine "ciclazelor" din grupa adenil- sau guanil-ciclazei care controlează metabolismul nucleotizilor ciclici (cAMP sau cGMP), adevăraţi mesageri secundari ai răspunsului celular. Recepţionarea informaţiei despre ligand şi transmiterea ei de la suprafaţa membranei către nucleu implică şi activarea sintezei unuia sau altuia dintre aceşti nucleotizi care se realizează condiţionat de natura biochimică a receptorului, structura ligandului, microviscozitatea membranei celulare în momentul stimulului etc.

**Relee biochimice de semnalizare şi activare celulară.** De regulă, imediat după recunoaşterea ligandului de către receptori şi legarea încrucişată a acestora, sunt activaţi diferiţi factori enzimatici de la nivelul membranei citoplasmatice sau chiar al nucleului care, după cum menţionam anterior, pot fosforila sau defosforila proteinele. Se pare că există cel puţin două clase de receptori prin care se realizează transducerea semnalelor membranare. O clasă depinde de hidroliza fosfatidil-inozitolului-4,5-difosfat ($PIP_2$) care generează IP3 şi DAG, iar alta de generarea cAMP ca mesager secund.

În figura 144 sunt prezentate schematic două astfel de situaţii diferite rezultate ca urmare a stimulării a două tipuri de receptori de acest gen de la nivelul membranei limfocitului *T*. În primul caz, imediat după recunoaşterea ligandului, informaţia este transmisă prin intermediul proteinei G la enzima guanilat-ciclază care controlează hidroliza GTP şi mobilizarea PLC de la nivelul citoplasmei înspre membrană. Ajunsă la acest nivel, PLC fosforilează PIP2 situat la graniţa dintre membrană şi citoplasmă din care va rezulta IP3, un agent extrem de potent şi selectiv pentru eliberarea $Ca^{2+}$ din reticulul endoplasmic şi DAG, stimulator al PKC. Prin defosforilări, IP3 poate reveni la PIP2 şi IP, ciclul continuând spre inozitol care, prin refosforilări, evoluează spre PI, PIP1 şi PIP2.

În această fază, $K^+$ părăseşte celula iar GTP este defosforilat sub acţiunea GTP-azei în GDP şi cGMP care, în prezenţa PKC, transmite semnale activatoare către nucleu. Inozitolul fosfat-3 mobilizează $Ca^{2+}$ din reticulul endoplasmic situat submembranar, cu care se asociază, stimulând atât deplasarea dinspre citoplasmă către membrană a proteinkinazelor, cât şi activitatea acestora. Împreună cu DAG favorizează influxul $Ca^{2+}$ şi $Na^+$ extracelular şi efluxul de $H^+$ cu modificarea *p*H-ului citoplasmei. La rândul ei, PKC activează sinteza IL-2, exprimarea receptorilor pentru IL-2 la nivelul membranei celulare şi depozitarea acesteia. Recunoaşterea IL-2 de către receptori va amplifica semnalele către nucleu, stimulând blastogeneza. În cazul stimulării receptorilor pentru autacoizi, ca de pildă diverşi hormoni, se formează o triadă funcţională la care participă receptorul, proteinele G care transduc semnalele de la receptor şi enzima adenilat-ciclază. Interacţiunea dintre ligand şi adenilat-ciclază declanşează hidroliza ATP şi formarea de cAMP. Proteinele G transmit semnalul de la receptor la adenilat-ciclază reglând nivelul cAMP prin stimularea sau inhibiţia funcţională a acestei enzime. Receptorii intracitoplasmatici pentru cAMP sunt proteinkinazele A, două izoenzime denumite I şi II, cu proprietăţi fizico-chimice diferite. În celula în repaus, PKA-I este localizată în citoplasmă iar PKA-II submembranar. Adenozin-monofosfatul ciclic formează un complex cu PKA-I şi PKA-II care se leagă la ADN alterând atât transcrierea cât şi evenimentele post-transcripţionale de la nivelul limfocitelor. Ca atare, cAMP mediază semnalele inhibitoare, antiproliferative pentru celulă. Efectul inhibitor generat de către ligand se poate realiza "indirect" prin stimularea PLA2 membranară, activarea metabolismului acidului arahidonic şi sinteza prostaglandinelor pe cale ciclooxigenazică. Acidul arahidonic şi diferiţii săi metaboliţi (eicosanoizii) acţionează ca mesageri intracelulari şi intercelulari. Precursorii acestui acid sunt acizii graşi încorporaţi în lipidele de membrană, schimbările în conţinutul acidului ducând la modificări în sinteza eicosanoizilor (prostaglandine, leucotriene) ca o consecinţă a hidrolizei lipidelor datorită activării PLC şi PLA2 de către receptor. PGE1 şi PGE2 au o acţiune blocantă asupra unor funcţii celulare, legarea lor la receptori generând semnale activatoare pentru adenilat-ciclaze. PGA, PGF1 şi PGF2 nu au astfel de efecte. Pe lângă activarea sintezei cAMP şi generarea semnalelor inhibitoare prin intermediul acestui grup de nucleotizi, o altă modalitate prin care prostaglandinele îşi pot exercita efectul lor inhibitor este blocarea sintezei IL-2.

*Activarea limfocitelor T stimulate prin TCR* se supune, în linii generale, aceloraşi reguli. La aceste celule, heterodimerul $\alpha\beta$ este asociat cu lanţurile $\gamma\delta\epsilon$ ale CD3 şi cu subunităţile $\zeta$ care transmit semnalele necesare activării genelor IL-2. După stimularea receptorului, primul eveniment care are loc este fosforilarea tirozinelor unui mare număr de proteine care includ lanţurile $\zeta$ ale TCR, PLC-$\gamma$1 şi CD5. Activarea PLC de către protein-tirozin-kinaze (PTK) induce hidroliza $PIP_2$, formarea de DAG şi IP3, mobilizarea $Ca^{2+}$, toate acestea ţintind activarea altor substanţe

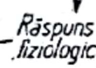





Fig.144. Reprezentarea schematică a unor modalități de reglare și interferență ale căilor biochimice intracelulare.

Stimularea celulei prin receptorul pentru antigen (RA) antrenează hidroliza inozitolilor și mobilizarea ionilor cu efecte activatoare asupra proliferării celulare sau asupra funcțiilor ei de sinteză. Stimularea este posibilă și prin alți receptori (RH = receptorul pentru hormoni, $PGE_2$-R = receptorul pentru prostaglandina $E_2$). Stimulul va modifica arhitectura dublului strat lipidic, generând formarea de acid arahidonic (AA) și a metaboliților acestuia. Derivații AA pot evolua pe cale lipooxigenazică (LO) sau ciclooxigenazică (CO), cu formarea de leucotriene (LT) cu rol în procesele inflamatorii sau de prostaglandine ($PGE_2$) și adenozin-monofosfat ciclic (cAMP). Intracelular, prostaglandinele activează adenilat-ciclaza (ACy), care controlează, prin activarea adenozin-trifosfatazei (ATP-aza), sinteza cAMP. ACy poate fi activată și de către prostaglandinele existente în afara celulei, care se pot fixa la receptorii lor de la nivelul membranei plasmatice ($PGE_2$-R). cAMP poate mobiliza proteinkinazele AI și AII (PKA-I, PKA-AII) formând complexe inhibitoare pentru funcțiile celulei, ca de pildă sinteza IL-2, sinteza de anticorpi, proliferarea celulei, exprimarea CD2, activitatea citotoxică etc. El se menține într-o relație de echilibru funcțional cu cGMP, influențându-se reciproc.

O altă cale de control implică intervenția fosfodiesterazei $E_2$ ($PDE_2$), care inhibă formarea cAMP atunci când acesta scapă de sub efectul inhibitor al $PGE_2$.

Lipocortina inhibă $PLA_2$ fiind un antagonist al metaboliților AA. Acidul acetil-salicilic (AAS) și indometacinul sunt inhibitori ai prostaglandinsintetazei și ai formării de prostaglandine.

AA = acid arahidonic; AAS = acidul acetilsalicilic; ACy = adenilat-ciclaza; ADP = adenozin-difosfat; ATP = adenozin-trifosfat; ATP-aza adenozinfosfatază; cAMP = adenozin-monofosfat ciclic; DAG = diacilglicerol; GDP = guanidin-difosfat; GTP = guanidin-trifosfat; GTP-aza = guanidin-fosfatază; cGMP = guanidin-monofosfat ciclic; IL-2 = interleukina 2; IL-2 R = receptor pentru IL-2; Ind = indometacin; G = proteina G ($\alpha, \beta, \gamma$); PLC = fosfolipaza C; PKC = protein-kinaze; $PLA_2$ = fosfolipaza $A_2$; $PGE_2$-R = receptor pentru prostaglandina $E_2$; PKA-I sau PKA-II = proteinkinaza AII sau A-II; ——→ semnale activatoare; – – –→ transmutație; xxxx► inhibiție.

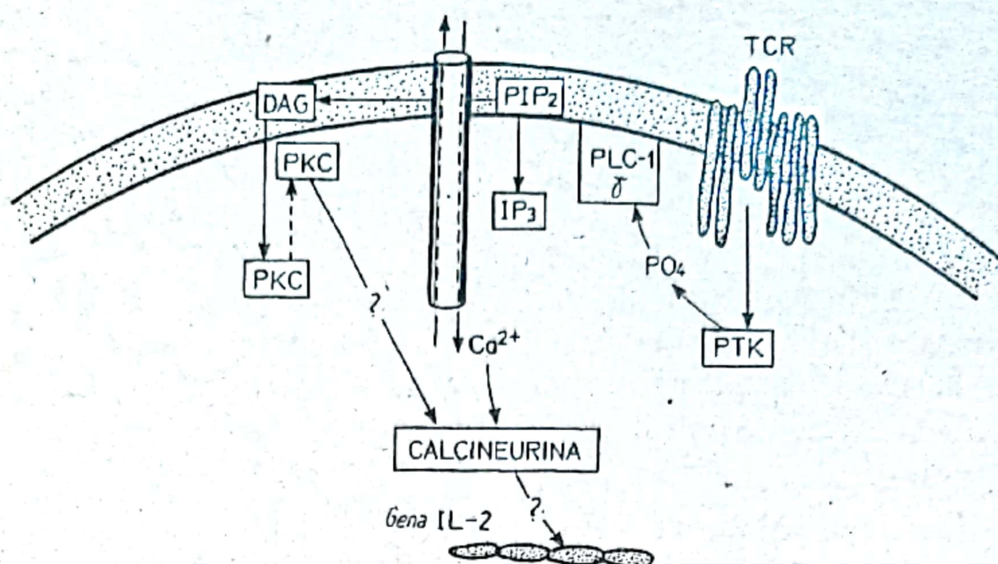



Fig.145. Evenimentele de transducere a semnalelor care au loc după stimularea receptorului pentru antigen (TCR) de la nivelul limfocitului T (după J.D. Fraser şi col.).

înainte de nucleu (fig. 145). Creşterea concentraţiei intracitoplasmatice a $Ca^{2+}$ duce la activarea enzimelor reglate de calmodulină cu implicarea calcineurinei (dependentă de calmodulină), activarea genei IL-2 şi a unor complexe de "factori nucleari" ca NK-kB, AP-1, AP-3, NF-AT etc. Ca urmare a acestor evenimente, are loc, în câteva minute, transcrierea unor gene cu rol în proliferarea celulei *T*, şi anume c-myc, c-fos, c-jun. Efectul semnalelor primite de la TCR este amplificat de alte semnale transmise de moleculele de adeziune (CD2, LFA-1, CD28, CD44) cu rol reglator critic pentru sinteza limfokinelor.

În reglarea cuplării antigenului cu TCR şi a transmiterii intracelulare a semnalelor, intervine şi proteina CD45 care are afiliată la extremitatea intracitoplasmatică o fosfotirozin-fosfatază (PTP-ază), cu rol de semnal coactivator în transmiterea mesajelor (fig. 146). Prin activitatea sa tirozin-fosfatazică, CD45

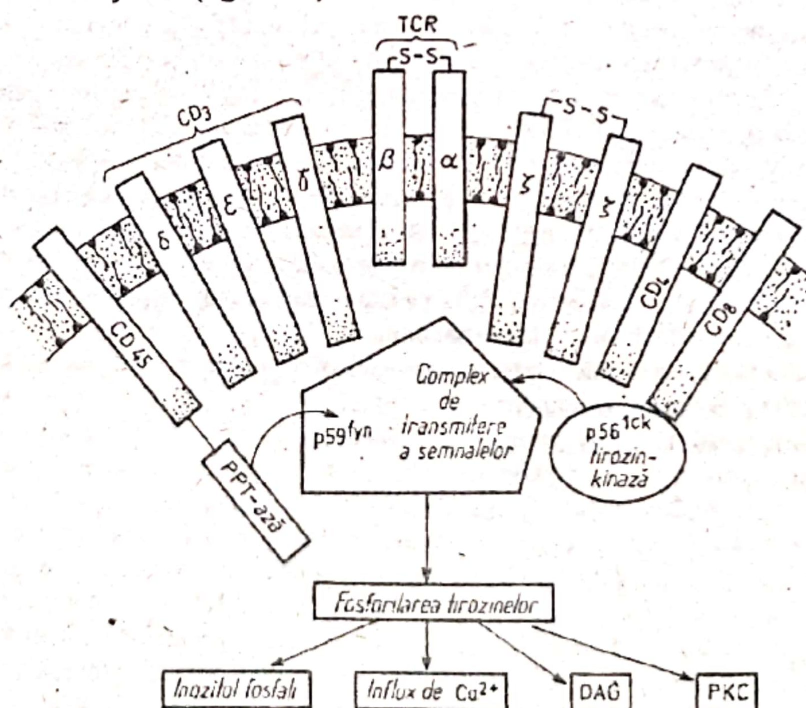



Fig.146. Implicarea CD45 în activarea limfocitelor T (după D. Alexander şi col.).

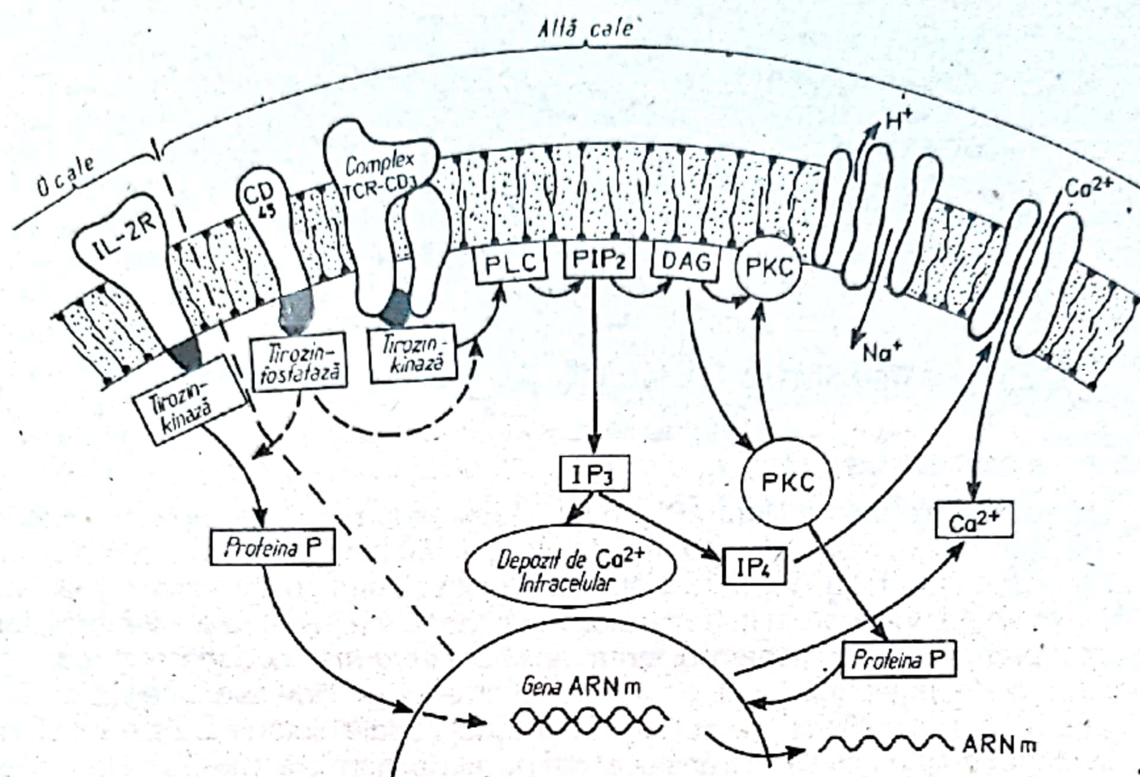



Fig.147. Legarea antigenului la complexul TCR-CDR este urmată de activarea PLC prin activitatea tirozinkinazică (TRK) a acestuia. Legarea IL-2 la receptorul ei (IL-2R), prin activitatea tirozinkinazică, poate "ocoli" calea de activare prin TCR-CD3. CD45 poate regla aceste căi de semnalizare prin activitatea sa tirozinfosfatazică (TRP) (după S. Damjanovich şi col.).

poate regla calea de semnalizare venită atât de la IL-2R cât şi de la complexul TCR-CD3 (fig. 147).

În sfârşit, legarea unor citokine la receptorii lor poate influenţa activarea limfocitelor *T*. De pildă, IL-1, IL-6 activează sinteza IL-2, pe când IL-10 o inhibă.

Este în afară de orice discuţie faptul că procesele biochimice care constituie "relee" de transmitere a informaţiei la şi de la suprafaţa celulei sunt mult mai complexe, exemplele de mai sus reprezentând doar o imagine estompată a acestei complexităţi. Descifrarea în continuare a acestor mecanisme care au loc la nivel molecular şi celular va permite o mai bună înţelegere şi stăpânire a unor procese intime ale vieţii care îmbracă aspecte "normale" sau "patologice".

# DETERMINISMUL GENETIC AL FUNCŢIILOR IMUNE

Sinteza proteinelor, indiferent dacă se găsesc sub formă de molecule libere sau de compuşi celulari, este controlată genetic. Genele de la nivelul ADN-ului celular ordonă modul de înşiruire a aminoacizilor în lanţul polipeptidic primar, iar ARN-ul execută acest ordin la nivel ribozomal. Modul de înşiruire a aminoacizilor în lanţul primar va condiţiona "buclarea" acestuia în forme secundare, terţiare şi cuaternare ale moleculei, locul, clasa şi cantitatea de glucide asociate moleculei respective, proprietăţile antigenice şi în final, funcţiile sale biologice. Este suficient ca un singur aminoacid să fie translocat din poziţia lui normală, pentru ca întreaga moleculă să fie modificată sub raport antigenic.

Situaţia este asemănătoare celei realizate prin adiţia, deleţia sau "translocarea" unei litere în şirul de litere care formează un cuvânt: uneori o unică modificare schimbă total semnificaţia mesajului transmis prin cuvântul respectiv. De pildă, conform simbolurilor actuale care definesc aminoacizii esenţiali prin literele alfabetului latin, alanina este notată cu A, cysteina cu C şi arginina cu R. Deci, tripeptidul Cys-Al-Arg poate fi notat CAR, care are o semnificaţie biochimică bine definită. Dar să considerăm numai semnificaţia lingvistică a acestor simboluri: este aceea de "car", adică de vehicul tractat de animale. Prin adiţia unui alt simbol, vom putea obţine ACAR sau CARA, deci un substantiv şi un adjectiv "înrudit" cu un cuvânt italian (cara = dragă), adică două noţiuni complet distincte între ele. Acelaşi efect se obţine şi prin translocarea unui singur aminoacid sau, în exemplificarea lingvistică dată, a unei singure litere: CAR = ARC = RAC, trei substantive diferite, deci cuvinte cu sensuri total diferite obţinute prin o simplă schimbare de poziţie a unei litere în cadrul unui şir de litere. Efectele similare realizează şi deleţia: ACAR = A + CAR.

Deci, respectarea strictă a ordinii literelor, aceste simboluri pentru sunet în şirul de litere ale unui cuvânt, menţine nealterată semnificaţia mesajului transmis, modificarea poziţiei, chiar minoră, putând schimba total sensul mesajului.

Exact aceeaşi situaţie este şi în structura proteinelor, orice modificare de poziţie în lanţul primar putând schimba profund funcţiile moleculei. Controlul genetic asigură conservarea ordinii de înşiruire a aminoacizilor şi, deci, realizarea unor molecule cu proprietăţi antigenice şi cu funcţii bine definite, care pot fi proprii tuturor indivizilor unei specii sau numai unor grupe de indivizi care aparţin aceleiaşi specii, sau chiar unui singur individ. De pildă, dacă un iepure este inoculat cu albumină umană, sistemul lui imun va recunoaşte moleculele de albumină ca străine datorită conformaţiei lor sterice particulare şi le va elimina imun, prin sinteza de anticorpi care vor recunoaşte specific ca străine toate moleculele de imunoglobulină sau albumină provenite de la oricare membru al speciei umane. Dacă, însă, aceste molecule sunt recoltate de la un om (donator)

şi inoculate altui om (receptor sau "gazdă"), ele vor fi acceptate ca proprii şi nu vor stimula sistemul imun al gazdei, de unde concluzia că structura moleculei de albumină este identică la toţi membrii speciei respective. Dacă se grefează o porţiune de piele de la un om la alt om, receptorul o va elimina imun recunoscând-o ca străină şi va păstra, ca şi în cazul iepurelui inoculat cu albumină, memoria imunologică a primului contact, la o nouă grefare cu pielea aceluiaşi donator rejectarea făcându-se mult mai rapid, adică în maniera răspunsului imun secundar. Aşadar, moleculele de albumină au o conformaţie structurală caracteristică speciei, adică este aceeaşi la toţi oamenii, iar cele care intră în componenţa pielii sunt caracteristice unui singur individ din totalitatea indivizilor care alcătuiesc specia respectivă din care cauză, atunci când sunt grefate unui alt receptor, sunt recunoscute ca străine şi eliminate imun.

Este evident faptul că gradul de diversificare, de " particularizare" a antigenicităţii moleculei este diferit: mai mare la ţesuturi şi mai mic la moleculele de imunoglobulină sau albumină, deoarece primele se deosebesc din acest punct de vedere de la individ la individ, iar celelalte doar de la specie la specie sau de la un grup de indivizi la alt grup de indivizi. De aici concluzia că sinteza lor este controlată de grupe de gene diferite, situate pe cromozomi diferiţi şi la nivele diferite (local) în cadrul aceluiaşi cromozom.

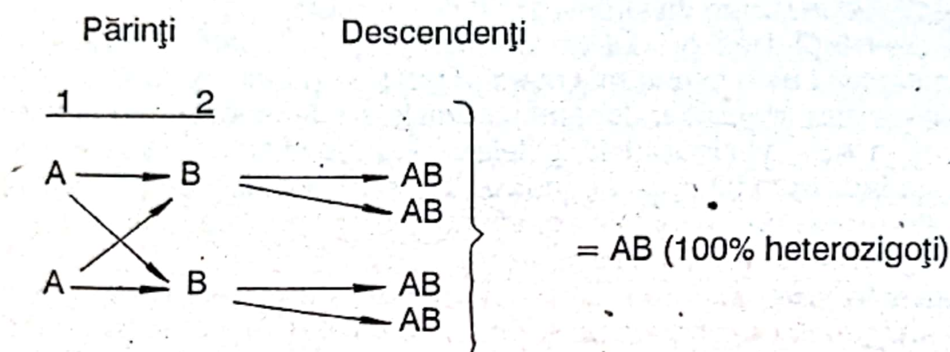
În ce priveşte sistemul imun, sunt bine cunoscute genele care controlează sinteza: a) antigenelor exprimate pe suprafaţa celulelor, responsabile de rejecţia grefelor de ţesuturi sau organe; b) moleculelor de imunoglobulină, libere sau ataşate la membrana limfocitelor *B* cu rol de receptor pentru antigen şi c) receptorilor pentru antigen de pe suprafaţa limfocitelor *T*.

## COMPLEXUL MAJOR DE HISTOCOMPATIBILITATE
### (MHC = MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX)

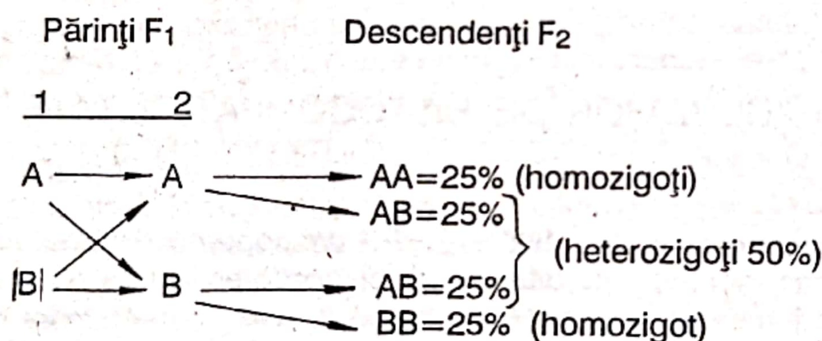
La începutul acestui secol, K. LANDSTEINER descoperea sistemul AB0 sau "grupele sangvine", semnalând diferenţieri şi apropieri antigenice la nivel eritrocitar şi seric între diferiţi subiecţi. Aproape în acelaşi timp, erau în plină desfăşurare cercetările legate de transplantarea tumorilor spontane sau induse experimental, cu care ocazie s-a observat că o tumoră, invadantă şi nocivă pentru animalul la care a apărut spontan, este recunoscută ca străină atunci când este transplantată la un alt animal şi eliminată imun. De aici concluzia că tumorile au "antigene tumorale" care pot stimula funcţiile imune ale gazdei. Ulterior însă, datele experimentale demonstrau fără echivoc că nu era vorba de antigene "specific tumorale", responsabile de rejecţie fiind de fapt antigenele ţesuturilor normale; orice ţesut normal prelevat de la un şoarece este rejectat atunci când este grefat altui şoarece. Un fragment de piele (grefon) provenit de la unul din părinţi, de pildă de la un şoarece din tulpina A, grefat la descendenţii $F_1$ rezultaţi din încrucişarea şoarecilor A cu cei din tulpina B, este acceptat. Dacă, însă, grefonul de piele a fost recoltat de la descendenţii $F_1$ şi grefat la părinţii A sau B, grefa nu este acceptată, fiind rejectată. S-a intuit astfel că rejecţia tumorilor şi ţesuturilor normale este un fenomen imun care se bazează pe legile lui Mendel ale disjuncţiei caracterelor, fiind posibilă calcularea numărului de gene care controlează sinteza diferitelor molecule implicate în stimularea organismului gazdă. Hibrizii $F_1$ obţinuţi din părinţii A ori B sunt AB, aşa că recunosc ca proprii atât caracterele A cât şi pe cele B, motiv pentru care nu elimină grefoanele provenite de la A sau de la B. Dacă însă

un şoarece din tulpina A este grefat cu piele provenită de la descendentul $F_1$, atunci, pe lângă caracterul antigenic A, va veni în contact şi cu caracterul B transmis de celălalt părinte pe care-l va elimina ca străin. Rejecţia nu are loc decât atunci când membrii unei populaţii nu sunt identici între ei din punct de vedere al antigenelor de histocompatibilitate. Identitatea poate fi realizată în trei moduri diferite, şi anume: *a)* la gemenii univitelini născuţi din acelaşi ovul; *b)* la hibrizii $F_1$, şi *c)* la tulpinile consangvine de şoareci, împerecheaţi frate cu soră (FxS) timp de cel puţin 20 de generaţii.

Hibrizii $F_1$, prin segregarea mendeliană a caracterelor, moştenesc genele de histocompatibilitate de la ambii părinţi, fiind din acest punct de vedere acceptori de grefă în proporţie de 100% conform următoarei relaţii:




Dacă parentalii diferă la un singur locus, cum este cazul hibrizilor $F_1$, atunci 3/4 din descendenţii $F_2$ vor accepta grefa.




Un părinte AB va accepta grefonul de la toţi hibrizii descendenţi pentru că recunosc ca propriu atât caracterul A cât şi pe cel B, dar $F_2$ AA va accepta numai grefe de la homozigoţii AA, respingând pe cele parentale sau de la restul de 75% descendenţi $F_2$AB sau BB. Deci, în cazul diferenţei la un singur locus de histocompatibilitate, 25% din descendenţi sunt omogeni pentru caracterul A, 25% omogeni pentru caracterul B, 75% (adică 3/4) vor accepta grefa cu caracterul A sau cu caracterul B(25% A + 50% AB, respectiv 25% B+50% AB), iar 25% o vor respinge. Dacă deosebirea este la doi loci, grefa este acceptată de $(3/4)^2$, adică de 9/16 respectiv 56,24%, la 3 loci de $(3/4)^3$, la 4 loci de $(3/4)^4$ etc., respectiv 27/64%, (42,18%), 87/256 adică de 33, 98% etc. Cu cât numărul locilor deosebiţi este mai mare, cu atât procentul şanselor de acceptare a grefei este mai mic.

Pe baza acestui gen de experimente, în anul 1914 C. C. LITTLE a emis "teoria genetică a tumorilor". În anul 1936, Peter GORER identifică la şoareci un antigen de grup sangvin pe care l-a denumit "antigenul II", iar un an mai târziu stabileşte relaţia existentă între acest antigen şi grefa de ţesut tumoral. El este primul care consideră că rejecţia de grefă este un fenomen imun datorat "incompatibilităţii dintre antigenul II al donatorului şi ţesuturile receptorului".

G.D.SNELL în 1946 obţine liniile consangvine de şoareci. LITTLE şi SNELL formulează "legile de transplantare", denumite de către unii "legile lui Little" iar de către alţii "legile lui Snell", care postulează următoarele:

1. Transplantul de ţesut între membrii unei tulpini inbred (consangvine) sunt acceptate în totalitate;

2. Transplantul de ţesut prelevat de la un donator aparţinând unei tulpini inbred, la o gazdă aparţinând altei tulpini inbred, este respins imun;

3. Transplantul de la o tulpină parentală la descendenţii $F_1$ este acceptat, dar de la $F_1$ la parental este rejectat;

4. Cea mai mare parte din $F_2$ (75%) acceptă grefa de la congenerii lor, dar o mică parte (25%) o resping.

În anul 1948, P.GORER şi G.P.SNELL botează locusul care codifică pentru antigenul II "histocompatibilitate II" sau H-2, care se dovedeşte a fi un complex de gene care ocupă mai mulţi loci pe un segment al cromozomului 17, cu rol capital în rejecţia ţesuturilor de transplantare, complex pe care l-au denumit "complexul major de histocompatibilitate" sau MHC (Major Histocompatibility Complex).

Toate acestea au permis formularea concluziei că atât rejecţia grefelor tumorale cât şi cea a ţesuturilor normale reprezintă un fenomen controlat genetic, acest control fiind efectuat de mai multe gene dominante care codifică sinteza unor proteine exprimate pe membrana celulară. Aceste proteine diferă de la o tulpină de şoareci la alta şi sunt responsabile de generarea reacţiilor imune atunci când ajung într-un organism care le recunoaşte ca non-proprii. Genele care codifică sinteza lor au fost denumite "gene de histocompatibilitate" sau H, iar proteinele a căror sinteză este controlată de ele, "antigene de histocompatibilitate" sau "antigene MHC." S-a observat că incompatibilitatea între diferite ţesuturi variază, în sensul că, în cazul unor deosebiri H, gazda elimină grefa primară violent şi rapid, iar în alte cazuri, eliminarea este mai mult sau mai puţin încetinită. De exemplu, grefa de piele prelevată de la unii şoareci şi transplantată la şoarecii aparţinând unor tulpini este eliminată în 12-16 zile, iar cei care aparţin altor tulpini elimină aceeaşi grefă în 100 de zile sau chiar mai mult. Aşa a fost identificată existenţa a două categorii de gene organizate în adevărate "aglomerări", un fel de "complexe genice: una care controlează sinteza unor antigene "puternice", responsabile de rejecţia accelerată, şi alta care controlează sinteza unor antigene mai slabe, mai apropiate structural de cele ale gazdei, care vor declanşa reacţii imune moderate şi tardive. Prima categorie este încadrată într-un "complex major de histocompatibilitate" sau MHC, termenul de "major" definind viteza rejectării grefei, iar cea de a doua, în "complexe minore de histocompatibilitate".

La toate speciile, există un singur MHC şi mai multe "complexe minore" situate pe diferiţi cromozomi, care controlează sinteza unor proteine cu o structură serică mai mult sau mai puţin diferită de cele ale gazdei care a recepţionat grefa, de unde şi durata de eliminare mai lungă sau mai scurtă a acestora. Cu alte cuvinte, cu cât numărul de loci detectaţi este mai mare (loci deosebiţi între ei), cu atât şi intensitatea rejecţiei va fi mai mare, şi invers. Antigenele MHC majore sunt rapid rejectate pentru că exprimă un mare număr de determinanţi antigenici diferiţi de cei existenţi în ţesuturile gazdei, iar cele minore mai lent, pentru că sunt mai apropiate de cele ale gazdei. Şi în cazul ţesutului tumoral situaţia este oarecum similară, în sensul că o tumoră a pielii, de exemplu, este mai lent rejectată în comparaţie cu pielea normală deoarece, în cazul malignizării, pielea exprimă mai puţini determinanţi antigenici decât pielea normală. În prima etapă identificarea deosebirilor genetice între diferiţi subiecţi se poate realiza prin grefe de organ sau de piele, procedeu frecvent folosit experimental în special la şoarece, sau prin metode serologice.

Determinarea serologică se face imunizând animalele unei tulpini consangvine (A) cu limfocite provenite de la animalele altei tulpini consangvine (B). În serul A vor apărea anitcorpi anti-B, care în prezenţa complementului vor liza celulele pe suprafaţa cărora se găsesc antigenele B. Dacă serul anti-B mai reacţionează şi cu limfocitele tulpinilor C,D sau E, înseamnă că toate aceste tulpini (B, C, D, E) au cel puţin un determinant antigenic comun (1), care însă nu există la A. Prin absorbţii selective se pot preciza numărul specificităţilor antigenice şi distribuirea lor în diverse populaţii. Astfel, în cazul în care serul anti-B absorbit cu C mai reacţionează cu limfocitele de la B, D şi E, dar nu şi cu cele de la C, se poate trage concluzia că celulele C au cel puţin o specificitate antigenică, adică specificitatea antigenică sau determinantul antigenic 1. La celelalte tulpini, pe lângă specificitatea 1, există şi alte specificităţi. După absorbţia cu limfocite de la D, serul mai reacţionează cu B şi E, dar nu cu C şi D. Deci, serul D are cel puţin două specificităţi, una comună cu C, respectiv specificitatea 1, şi alta specifică pentru D, specificitatea 2.

Absorbit cu E, serul mai reacţionează cu limfocitele tulpinii B, dar cu nici una dintre celelalte tulpini cercetate, de unde concluzia că B are cel puţin patru specificităţi (1, 2, 3, 4), dintre care una este prezentă numai la celulele liniei B (specificitatea 4). Această specificitate antigenică proprie indivizilor unei linii consangvine, deci care nu se găseşte la alte tulpini, se numeşte "antigen particular" sau "antigen privat", iar determinanţii antigenici comuni mai multor linii de animale, responsabili de reactivitatea încrucişată, se numesc "antigene publice"(tabelul 89).

*Tabelul 89*

**Determinarea specificităţilor antigenice prin absorbţia încrucişată a antiserurilor**

| Absorbţia serului imun cu celule de la animale | Specificitatea | Reacţia serului cu celule de la animale | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | B | C | D | E |
| A | 0 | + | + | + | + |
| B | 1, 2, 3, 4 | - | - | - | - |
| C | 1 | + | - | + | + |
| D | 1, 2 | + | - | - | + |
| E | 1, 2, 3 | + | - | - | - |

- ; + = reacţie negativă sau pozitivă (lipsa sau prezenţa efectului citotoxic al serului după absorbţie cu diferite limfocite)

La om nu se pot obţine "tulpini consangvine", aşa că se folosesc seruri imune provenite de la "imunizări naturale" (politransfuzaţi, femele multipare fertilizate de diverşi masculi etc.). În afară de această metodă serologică de citotoxicitate, în prezenţă de complement, se mai foloseşte şi metoda "reacţiei mixte limfocitare" (MLR = mixed lymphocyte reaction) care constă din incubarea *in vitro* a limfocitelor *T* în prezenţa de limfocite *B* cu alte antigene MHC. În cazul în care, pe suprafaţa limfocitelor *B* există determinanţi antigenici controlaţi de MHC care nu sunt exprimaţi şi pe celulele *T*, aceştia vor stimula limfocitele *T* care vor prolifera.

În ultimii ani, studiile de genetică privind HLA au folosit ca metode serologice leucoaglutinarea, limfocitotoxicitatea dependentă de complement şi mai târziu testul ELISA (enzyme-linked immunoassay) în care, în loc de aloantiseruri obţinute de la multipare sau de la politransfuzaţi, se folosesc anticorpi monoclonali cu specificităţi de recunoaştere bine definite.

Complexele MHC conţin un mare număr de gene ale căror poziţii şi denumiri diferă de la specie la specie, cele mai bine cunoscute fiind cele din componenţa H-2 şi HLA (tabelul 90).

Semnificaţia biologică a MHC nu se limitează numai la imunitatea de transplantare a ţesuturilor normale sau tumorale, ci şi la asocierea cu diferite boli. Genele acestui complex sunt implicate în restricţia răspunsului imun, în prezentarea antigenului, de către celulele antigen prezentatoare (APC) limfocitelor *Th, în cooperarea limfocitelor T* cu celulele *B* şi implicit în stimularea producţiei de anticorpi, în limfoliza mediată celular etc. De asemenea, moleculele de clasa I ar forma o parte integrantă a receptorilor pentru hormoni interacţionând cu unii dintre aceştia ca, de pildă, cu insulina, cu factorul de creştere a epidermului (EGF) etc.

*Tabelul 90*

**Denumirea complexelor majore de histocompatibilitate la diferite specii**

| Specia | Simbol | Semnificaţia simbolului |
|---|---|---|
| Şoarece | H - 2 | Histocompatibility - 2 |
| Om | HLA | Human leukocyte antigen |
| Porc | SLA (sau PLA) | Swine (pig) leukocyte antigen |
| Cobai | GPLA | Guinea - pig leukocyte antigen |
| Iepure | RLA | Rabbit leukocyte antigen |
| Câine | DLA | Dog lymphocyte antigen |
| Cimpanzeu | ChLA | Cimpanzee leukocyte antigen |
| Şobolan | RT1 | Rat transplantation 1 |
| Bou | BoLA | Bovine leukocyte antigen |
| Oaie | OLA | Ovine leukocyte antigen |

Din punct de vedere istoric, acumularea cunoştinţelor privind rolul antigenelor de histocompatibilitate a fost realizată în mai multe etape:

*a.* Identificarea, prin grefe de ţesut normal sau tumoral, sau prin teste serologice, a existenţei complexului MHC;

*b.* Descoperirea genelor care controlează răspunsul imun, numite IR ("imune response" sau de răspuns imun) care s-au dovedit a face parte integrantă din complexul MHC;

*c.* Demonstrarea faptului că răspunsul imun al limfocitelor T se face numai sub "restricţie MHC", adică numai în condiţiile controlului funcţiei de recunoaştere a antigenului de către limfocitele T;

*d.* Definirea, prin metode cristalografice, a structurii antigenelor MHC.

În prezent, se încearcă stabilirea unei eventuale corespondenţe existente între MHC şi unele boli.

## ANTIGENELE MHC

Orice celulă exprimă pe suprafaţa sa molecule cu proprietăţi antigenice particulare, a căror sinteză este sub controlul genelor din MHC. Aceste molecule sunt foarte polimorfe şi înalt antigenice, aparţinând la trei clase distincte - I, II şi III- cu proprietăţi antigenice şi alcătuire moleculară diferită.

**Moleculele aparţinând clasei I** sunt glicoproteine oligomerice cu un lanţ polipeptidic $\alpha$ de 43-45 kD şi unul polipeptidic neglicozilat de 12 kD, care de fapt este $\beta_2$ - microglobulină ($\beta_2$-m) legată covalent de lanţul $\alpha$, a cărui sinteză este controlată de gene situate pe alt cromozom. Genele care codifică pentru antigenele MHC de clasa I aparţin la două categorii: una, care codifică pentru lanţul $\alpha$ situată la nivelul locilor K şi D (la şoarece) sau B, C, A (la om), alcătuită din gene foarte polimorfe şi ubicuitare, şi alta, care codifică pentru lanţul $\alpha$ al moleculelor Qa şi T1, mai puţin polimorfe şi cu funcţii insuficient cunoscute. La om există 8 exoni care codifică pentru antigenele MHC de clasa I, după cum urmează: exonul 1 care nu este "tradus", exonii 2, 3 şi 4 care codifică pentru domeniile $\alpha_1$, $\alpha_2$ şi $\alpha_3$, exonul 5 pentru segmentul transmembranar şi exonii 6, 7 şi 8, pentru segmentul intracitoplasmatic. Antigenele de clasa I sunt proteine integrate în membrana celulară, exprimate în număr de cca. $1x10^4$ - $2x10^6$ molecule pe suprafaţa celulelor nucleate. Sunt prezente pe suprafaţa tuturor celulelor cu excepţia eritrocitelor. Au o distribuţie slabă la nivelul spermatozoizilor, hepatocitelor, neuronilor, glandelor endocrine, placentei, muşchilor netezi şi striaţi, precum şi la nivelul limfocitelor $CD4^+$ de la pacienţii infectaţi cu HIV. Eritrocitele exprimă între 500 şi 2 000 de molecule/celulă iar limfocitele *T* şi *B*, cca. $1x10^5$ molecule. Aceste molecule pot fi eliberate în circulaţie de către limfocitele *T* şi *B* stimulate cu activatori policlonali. Lanţul $\alpha$, de tip imunoglobulinic, are trei domenii extracelulare denumite $\alpha_1$, $\alpha_2$ şi $\alpha_3$ cu cca. 283 reziduuri de aminoacizi. Domeniul $\alpha_1$ este alcătuit din cca. 90 de reziduuri de aminoacizi, cu legături disulfidice intralanţ. Domeniile $\alpha_2$ şi $\alpha_3$ au în componenţa lor aproximativ acelaşi număr de aminoacizi, cu legături disulfidice intralanţ. Ca şi în cazul moleculelor de imunoglobulină, variabilitatea în secvenţa aminoacizilor este cu atât mai mare cu cât poziţia acestora este mai apropiată de extremitatea $NH_2$ terminală. Ca atare, domeniul $\alpha_3$ este cel mai constant şi mai apropiat antigenic de moleculele de clasa I ale speciei respective. Domeniile $\alpha_1$ şi $\alpha_2$ conţin situsuri de recunoaştere pentru anticorpi şi pentru celulele *T*. Fiecare lanţ $\alpha$ este ancorat la celulă printr-o piesă transmembranară care conţine cca. 23 reziduuri de aminoacizi hidrofobi şi prin alta intracitoplasmatică, COOH terminală, cu 25 - 32 reziduuri hidrofile. La domeniul $\alpha_3$ al lanţului şi ceva mai puţin la domeniul $\alpha_2$, este ataşat necovalent lanţul $\beta_2$–microglobulină, a cărui sinteză nu este controlată de către genele care intră în componenţa MHC, ci de către gene situate pe alţi cromozomi (la om, cromozomul 15). Lanţul $\beta_2$-microglobulină există şi ca moleculă liberă în ser şi în urină, având o structură similară domeniului constant al imunoglobulinelor. Prezenţa lui la nivelul moleculei de clasa I conferă stabilitate spaţială şi posibilitatea de exprimare a lanţului greu $\alpha$. Imediat după sinteza sa, lanţul greu $\alpha$ este ancorat în membrana reticulului endoplasmatic unde în decurs de câteva minute se asociază cu $\beta_2$-microglobulina care joacă un rol important în transportul său intracelular. După glicozilarea N-terminală, moleculele de clasa I sunt exprimate în 30 - 45 de minute pe suprafaţa celulei. De aceea celulele care nu pot sintetiza $\beta_2$-microglobulina, ca de pildă linia Daudi deşi posedă lanţurile $\alpha$ în interiorul citoplasmei, nu exprimă moleculele de clasa I pe suprafaţa lor. Interferonul-$\gamma$ reglează asamblarea lanţurilor $\alpha$ şi $\beta_2$-microglobulinei, în special în unele celule tumorale cu deficit de exprimare a antigenelor de clasa I MHC. În celulele tratate cu IFN-$\gamma$ creşte nivelul ARN mesager care controlează şi transmite mesajele privitoare la transcripţia sintezei acestor molecule. Efecte similare are şi TNF-$\alpha$, deosebindu-se de majoritatea virusurilor care inhibă exprimarea lor.

Structura generală a moleculei de clasa I MHC este bine conservată în evoluţia filogenetică, fiind similară la toate speciile de mamifere, în ciuda enormei variabilităţi a secvenţei reziduurilor de aminoacizi care realizează particularităţi anti-

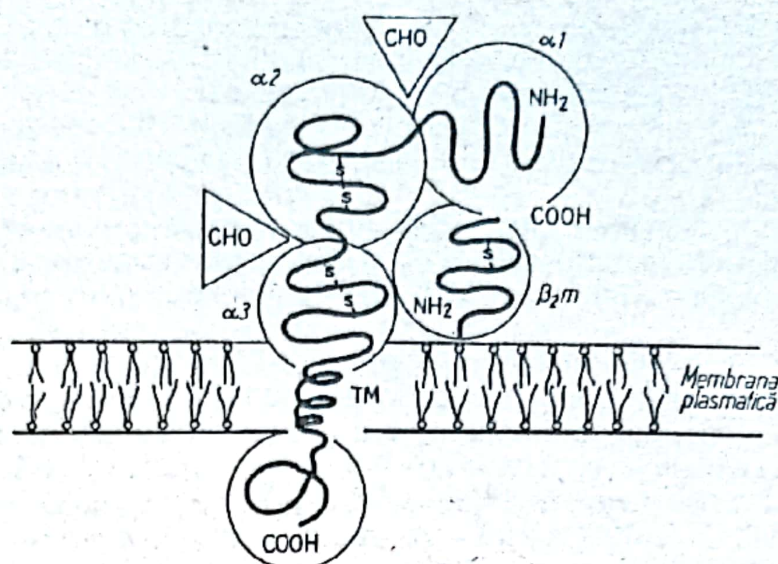



Fig.148. Antigenul MHC de clasa I. Molecula este formată dintr-un lanţ lung ($\alpha$) cu trei domenii extracelulare ($\alpha$1, $\alpha$2, $\alpha$3), unul transmembranar (TM) şi unul citoplasmatic cu extremitatea COOH terminală. În dreptul domeniilor $\alpha$2 şi $\alpha$3 este ataşat un lanţ scurt, $\beta$2-microglobulina ($\beta$2-m). La primele două domenii sunt ataşaţi hidraţii de carbon (CHO) (după R.J. Duquesnoy şi M. Trucco).

genice caracteristice până la nivel de individ (fig. 148). Exprimarea acestor antigene pe suprafaţa celulelor este modulată de către diverşi stimuli fiziologici (stimuli alogenici, mitogenici, IFN-$\gamma$ etc). Moleculele de clasa I poartă un mare număr de determinanţi alogenici, descrişi ca antigene publice sau private, care se găsesc în special la nivelul domeniilor $\alpha_1$ şi $\alpha_2$. Poziţiile în care există cea mai mare lipsă de asemănare între diverşi indivizi sunt cele dinspre extremitatea $NH_2$ terminală, la nivelul reziduurilor 1 - 90 ale domeniului $\alpha_1$ şi la poziţiile 91 - 182 ale domeniului $\alpha_2$. Reziduurile 183 - 273 ale domeniului $\alpha_3$ sunt ceva mai constante. Dar, cea mai mare variabilitate a aminoacizilor este la nivelul a 8 poziţii, dintre care trei la nivelul domeniului $\alpha_1$ (poziţiile 9 - 12, 40 - 45 şi 62 - 80), trei în $\alpha_2$ (94 - 97, 105 - 116 şi 137 - 163), una la joncţiunea dintre $\alpha_2$ şi $\alpha_3$ (poziţiile 173 - 194) şi una la nivelul domeniului $\alpha_3$ (poziţiile 239 - 245). Pe suprafaţa celulelor, sunt ataşate prin ancorări fosfolipidice sau integrate total în membrana celulară şi unele molecule asemănătoarare celor de clasa I, asociate cu $\beta_2$-microglobulina, dar cu domeniile externe $\alpha_1$, $\alpha_2$ şi $\alpha_3$ codificate de către exoni separaţi. Mai bine cunoscute sunt antigenele Qa, Qb, Tla şi Hmt.

**Moleculele Qa** sunt polipeptide de clasa I asociate cu $\beta_2$-microglobulina, cu greutatea moleculară de cca 40 kD, a căror sinteză este controlată de către un set de 10 gene (Qa-1 până la Qa-10). Polimorfismul lor este controlat doar de presori selectivi şi ca atare este mai puţin manifest. Unele dintre aceste molecule sunt exprimate exclusiv la nivelul unui organ, iar altele la nivelul altui organ. De exemplu, Qa-2 ar fi exprimate numai pe celulele hematopoietice, iar Qa-10 numai pe hepatocite. Deoarece determinanţii Qa sunt exprimaţi pe celule în diferite faze evolutive, prezenţa lor poate servi ca marker al dezvoltării acestora. Astfel, 5 - 6% dintre timocitele $CD3^+$ exprimă Qa-2 la intensităţi diferite: unele, denumite Qa-$2^{high}$ (Qa-$2^h$) exprimă cca $6 \times 10^4$ molecule/celulă, iar altele doar $6 \times 10^3$ molecule/celulă (Qa-$2^{low}$, sau Qa-$2^l$). Nici unele nici altele nu exprimă aceste molecule mai devreme de trei săptămâni de viaţă. Limfocitele *B* exprimă de 10 ori mai puţine Qa decât limfocitele *T*.

Polipeptidele Qa-7 şi Qa-9 sunt ataşate la membrana splenocitelor printr-o ancoră fosfolipidică şi, ca şi alte molecule fosfolipidice, ca de pildă fosfatidil-inozitolii, participă *in vitro* la activarea celulelor *T*. Moleculele Qa-2, sensibile la PLC,

sunt exprimate de precursorii $CD4^{+}/CD8^{+}$, iar cele rezistente pe $CD4^{-}/CD8^{+}$. În timpul activării celulelor *T*, schimbările în proprietățile structurale ale Qa-2 sunt însoțite de scăderea exprimării lor pe suprafața celulei.

*Moleculele QB-1 (Q4)* sunt glicoproteine de 47 kD asociate cu $\beta_2$–microglobulina. Pot fi detectate în lizatele splenice cu ajutorul anticorpilor anti-$\beta_2$-microglobulină.

*Moleculele Tla* (Thymus Leukaemia Antigen) sunt exprimate pe celulele leucemice, pe timocitele normale imature și pe celulele Langerhans. Se cunosc 7 specificități serologice diferite care definesc 6 haplotipuri numerotate de la $Tla^{a}$ până la $Tla^{f}$.

Toate aceste molecule similare celor de clasa I MHC ar avea funcții biologice multiple: receptori pentru virusuri, rol în adeziune, factori de creștere, rol în exprimarea unor receptori pentru hormoni, în prezentarea antigenelor $\gamma$-endorfine etc. Moleculele solubile ar avea funcții de hormoni în embriogeneză și ar contribui la inducerea toleranței. Unele dintre ele sunt exprimate pe celulele tumorale care nu exprimă MHC, făcându-le să fie totuși recunoscute de către limfocitele *Tc* cu receptori $\gamma\delta$.

**Clasa a II-a de molecule** este alcătuită din lanțurile $\alpha$ și $\beta$, două glicoproteine heterodimere distincte de cca. 32 - 34 kD, respectiv 26 - 29 kD. Sunt legate între ele prin forțe necovalente și au fiecare un domeniu extracelular cu 195 - 199 aminoacizi și câte două legături disulfidice intralanț care formează câte două bucle, $\alpha_1$ și $\alpha_2$ la nivelul lanțului $\alpha$ și $\beta_1$ și $\beta_2$ la nivelul lanțului $\beta$, un segment transmembranară cu cca. 23 aminoacizi și un domeniu intracitoplasmatic (fig. 149). Ambele lanțuri leagă hidrați de carbon. Lanțul $\alpha$ are două catene oligozaharidice laterale, iar $\beta$ doar una. Domeniile $NH_2$-terminale $\alpha_1$ și $\beta_1$ sunt foarte polimorfe, pe când cele $\alpha_2$ și $\beta_2$ sunt mai constante, fiind asemănătoare cu regiunile constante ale imunoglobulinelor. Segmentul transmembranar are cca. 25 de reziduuri de aminoacizi hidrofobi, iar cel citoplasmatic, cca. 10 - 20 de reziduuri. Domeniile $\alpha_1$ și $\alpha_2$ leagă hidrații de carbon la radicalii de asparagină din pozițiile 78 și 118, iar lanțul $\beta$ leagă un glican la poziția 19. Regiunea de gene din complexul MHC care codifică pentru moleculele clasei II, denumită HLA-D, codifică de fapt pentru mai multe tipuri de molecule care au toate aceeași structură, deși există considerabile diferențe biochimice între moleculele controlate de cele trei subregiuni DP, DQ și DR. Sunt exprimate selectiv pe suprafața limfocitelor *B*, monocitelor și macrofagelor, pe alte celule antigen prezentatoare,

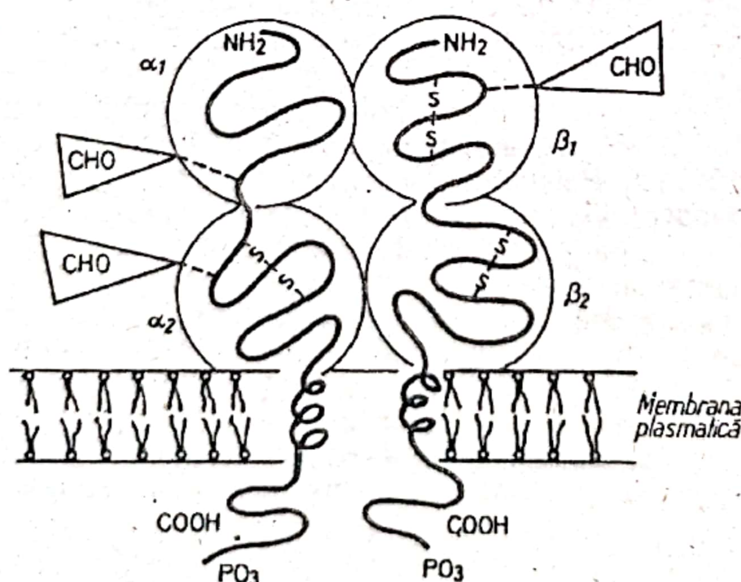



Fig.149. Antigenul MHC de clasa II. Molecula este alcătuită din două lanțuri, $\alpha$ și $\beta$, fiecare cu câte două domenii ($\alpha$1, a2 respectiv $\beta$1, $\beta$2) cu situsuri de fosforilare (PO3) și de atașare a hidraților de carbon (CHO) (după R.J. Duquesnoy și M. Trucco).

pe limfocitele *T* activate, în special pe cele *T* ajutătoare, pe celulele epiteliului timic. Lipsesc pe precursorii limfocitari *B*, apar pe suprafaţa limfocitelor *B* imunocompetente aproape simultan cu moleculele de imunoglobulină, pentru ca să dispară pe plasmocite. Exprimarea lor este activată de anticorpi anti-imunoglobulină, de IL-4, care acţionează la nivelul transcripţiei genelor şi este inhibată de IFN-$\gamma$ care blochează efectul activator al IL-4.

În cazul macrofagelor, IFN-$\gamma$ nu este antagonist cu IL-4 şi, în consecinţă, nu are efecte inhibitoare asupra exprimării lor. Glicocorticoizii, prostaglandinele, alfa-fetoproteina, cAMP, unele virusuri inhibă sinteza sau exprimarea moleculelor de clasa a II-a MHC. Aceste molecule se găsesc exprimate şi sunt recunoscute în relaţie cu un antigen străin, acţionând ca elemente restrictive. Restricţia Th este o consecinţă a polimorfismului molecular de clasa I. Celulele care exprimă moleculele de clasa II le exprimă şi pe cele de clasa I astfel că, din acest punct de vedere, există celule care posedă numai clasa I şi care alcătuiesc cvasitotalitatea celulelor organismului, precum şi unele care exprimă ambele clase şi care se limitează numai la populaţiile care intră în componenţa sistemului imun (fig. 150).

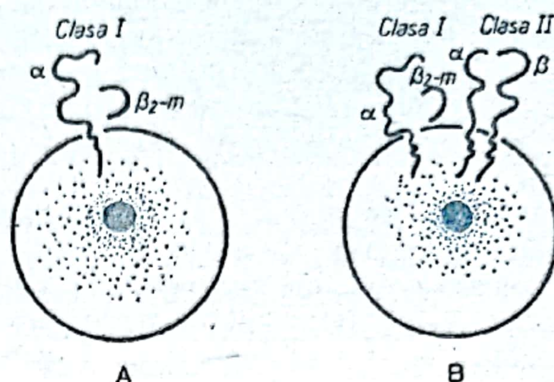



Fig.150. Antigenul MHC de clasă I este exprimat, cu mici excepţii, pe toate celulele organismului (A). Antigenul MHC de clasa II este exprimat, împreună cu cel de clasa I, pe suprafaţa limfocitelor B, celulelor APC, pe Th activate (B).

Deci, moleculele MHC de clasa I, denumite iniţial şi "SD" (definite serologic) şi cele de clasa II denumite "LD" (definite limfocitar, adică prin reacţii celulare şi nu serologice) sunt sintetizate sub controlul unor gene diferite, au organizare moleculară diferită şi funcţii biologice distincte (tabelul 91).

*Tabelul 91*

**Proprietăţile moleculelor de clasa II şi clasa I**
**(după M.A.Robinson şi T.J. Kindt)**

| Proprietatea | Molecule de clasa | |
|---|---|---|
| | I | II |
| Regiunea genelor * | K + D | I (A + E) |
| Rejecţia grefelor | ++++ | + |
| Reacţii GVH | + | ++++ |
| Funcţii de stimulare în MLR | + | ++++ |
| Funcţii citotoxice în MLR | ++++ | + |
| Distribuţie tisulară | Ubicuitar | Pe limfocite şi macrofage |
| Compoziţie chimică | Un lanţ glicoproteic cu un lanţ $\alpha$ cu un lanţ $\beta_2$ - microglobulinic | Două lanţuri glicoproteice ($\alpha\beta$) |
| Restricţie la nivelul | Celulelor ţintă | Celulelor atg-prezentatoare |

* Regiunea de la nivelul MHC la nivelul căreia se găsesc genele care controlează sinteza lanţurilor;
GVH = reacţie grefă contra gazdă; MLR = reacţie mixtă limfocitară;
+, ++, +++ = diferite intensităţi ale reacţiilor.

Funcţiile biologice ale moleculelor de clasa II sunt exprimate în contextul recunoaşterii antigenului prezentat de către celulele prezentatoare de antigen, limfocitele T, având rol în reglarea şi restricţia răspunsului imun. Acestea pot recunoaşte antigenul străin numai atunci când celulele APC îl prezintă asociat cu moleculele respective jucând din acest punct de vedere rolul elementelor de restricţie.

**Moleculele de clasa III** sunt componentele C2, C4 şi factorul B (Bf) al complementului, proteina Slp legată de sexul masculin XY (sex linked protein) şi o hidroxilază. Aceste molecule nu fac parte propriu-zis din MHC, fiind sintetizate sub controlul unor gene intercalate în genele acestui complex ca urmare a unei translocaţii.

## STRUCTURA GENELOR MHC

**Complexul H-2** al şoarecelui, situat pe cromozomul 17 în vecinătatea complexului Tla, are trei regiuni de gene distincte care codifică pentru cele trei clase de molecule cu rol în recunoaşterea imună şi în semnalizarea intercelulară. Ca şi complexul HLA de la om, complexul H-2 codifică pentru sinteza unor molecule cu un polimorfism fantastic, polimorfism care se referă la marele număr de variante existent la nivelul aceluiaşi locus şi, ca atare, exprimat fenotipic foarte diferit. La şoarece, regiunile K şi D din complexul H-2Qa şi Tla din complexul Tla codifică pentru moleculele de clasa I, regiunea I pentru cele de clasa II şi regiunea S pentru cele de clasa III.

Regiunea K are două gene fiind situată spre centrometrul cromozomului 17, iar regiunea D are 5 gene la şoarecii BALB/c şi doar una la $B_{10}$. Regiunile Qa cu 8 gene la BALB/c şi 16 la $B_{10}$ şi Tla cu 19 la BALB/c şi 15 la $B_{10}$ sunt situate către telomer (fig. 151). Între regiunile S şi D ar mai exista regiunea G (H-2G) care codifică pentru unele enzime ce nu au nici o legătură cu funcţiile imune. Regiunea I codifică pentru lanţurile $\alpha$ şi $\beta$, având doi loci, I-A şi I-E, şi nu cinci, cum se credea până nu demult (I-A, I-B, I-J, I-E şi I-C). De fapt, locii A şi B formează locusul A, C şi E, iar I-J nu codifică direct pentru nici un lanţ polipeptidic. Regiunea S codifică pentru patru molecule, D pentru trei iar Qa şi Tla au loci care codifică pentru mai

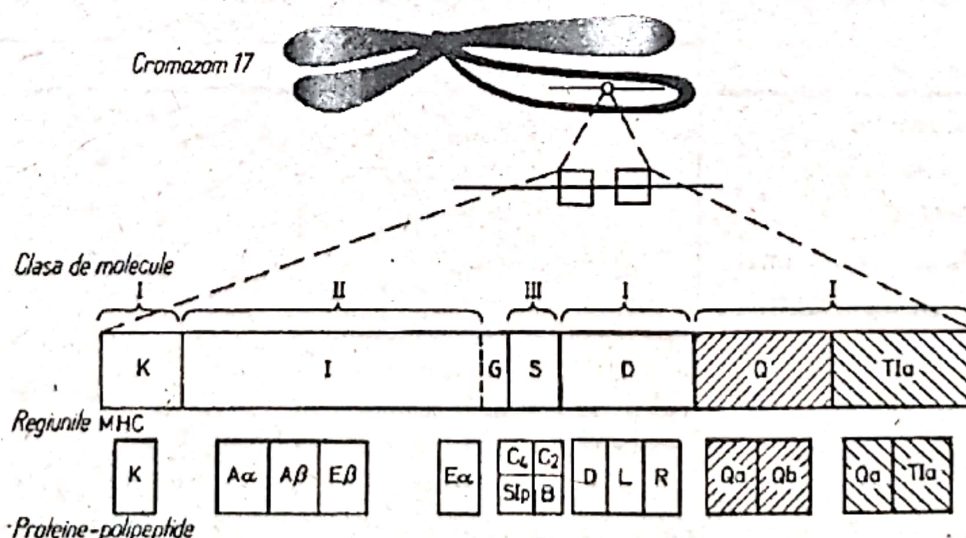



Fig.151. Organizarea regiunilor complexului H2 la şoarece.

mult de 25 de molecule din clasa I care ar funcţiona în diferenţierea hematopoietică şi ar acţiona ca ţinte pentru *NK*. Între regiunile S şi D sunt locii genelor care codifică pentru TNF-$\alpha$ şi pentru limfotoxine (fig. 152). Complexul H-2 conţine cel puţin 48 de gene: regiunea K conţine 2 gene care codifică pentru moleculele de clasa I, regiunea I şapte gene care codifică pentru moleculele de clasa II, iar regiunile distale D şi Q cuprind 13 gene care codifică pentru moleculele de clasa I şi două pentru TNF-$\alpha$ şi TNF-$\beta$ (limfotoxina), restul fiind în regiunea Tla. Fiecare codon are mai mulţi exoni (gene active) şi introni (pauze între exoni), exonii controlând sinteza fiecărui segment al lanţului peptidic. De exemplu, genele care codifică pentru lanţul polipeptidic $\alpha$ al moleculei de clasa I au 8 exoni şi 7 introni (fig. 153). Fiecare exon va dicta secvenţa poziţiilor unui anumit număr de reziduuri de aminoacizi în lanţ.

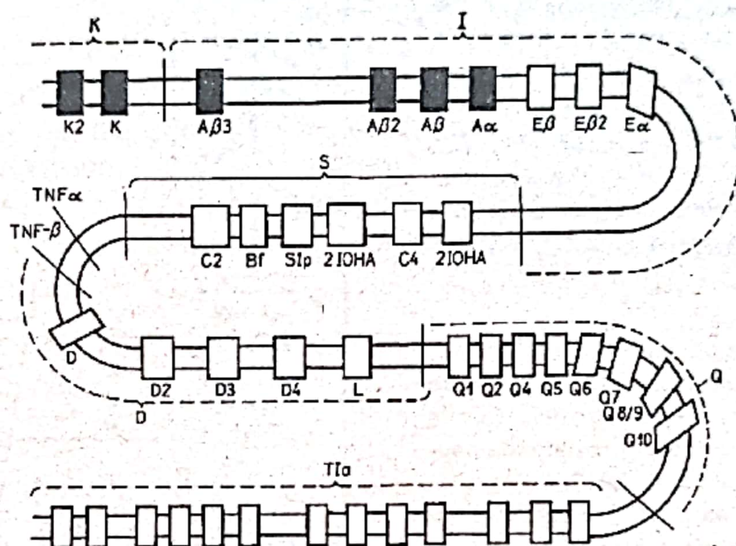



Fig.152. Sistemul H-2 cu genele care intră în componenţa sa. Exonii (pătratele negre şi albe) care controlează sinteza diferitelor segmente ale lanţurilor sunt despărţite de introni (spaţiile dintre exoni) (după M.A. Robinson şi T.J. Kindt).

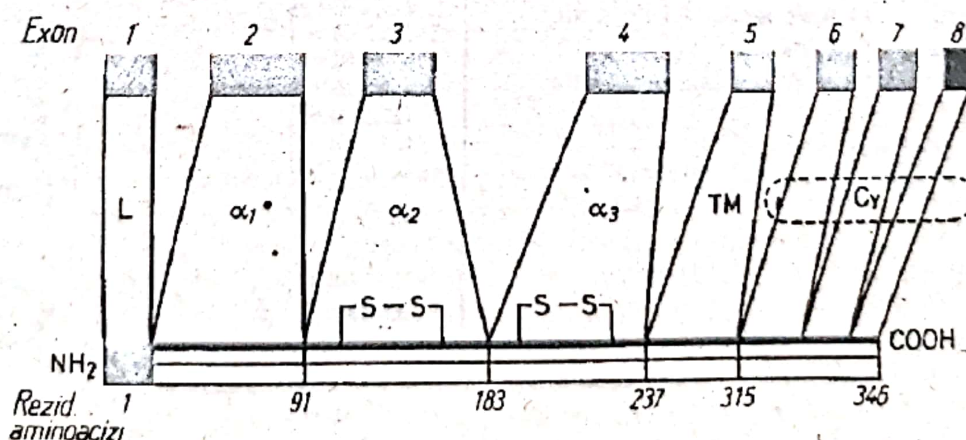



Fig.153. Poziţia exonilor care codifică pentru diferite segmente ale lanţului $\alpha$ al moleculei MHC de clasa I. Primul exon codifică pentru peptida "leader" (L) de cca. 20 de reziduuri de aminoacizi prezentă la nivelul lanţului, din momentul sintezei până la exprimarea lui pe suprafaţa celulei. Exonii 2,3 şi 4 codifică pentru domeniile $\alpha$1, $\alpha$2, şi $\alpha$3, fiecare având cca.90 de reziduuri de aminoacizi, exonul 5 codifică pentru segmentul transmembranar (TM) şi pentru un scurt fragment din domeniul intracitoplasmatic (Cy), exonii 6,7 şi 8 pentru câte 10 reziduuri de aminoacizi din restul celor 30-40 existenţi spre extremitatea COOH terminală (după M.S.Robinson şi T.J. Kindt).

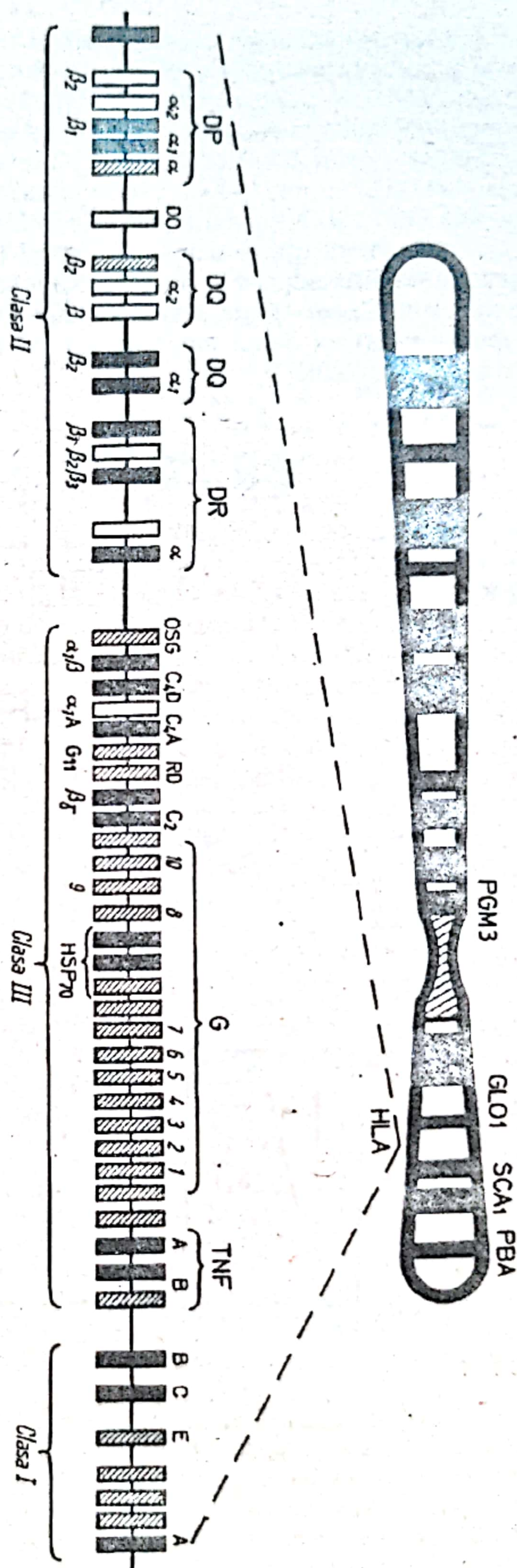



Fig.154. Sistemul HLA. Genele care controlează sinteza antigenelor HLA la om sunt situate pe braţul scurt al cromozomului 6, fiecare locus putând fi ocupat de mai multe alele. Către centromer este gena $\alpha$ pentru colagen de tip XI (Col11A). Urmează trei regiuni de gene sub controlul cărora se află antigenele MHC de clasele II, III şi I. În regiunea II sunt gene notate cu litere şi cifre. Pentru lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ ale antigenelor de clasa II codifică genele A şi B. Genele DR$\beta$1 şi DR$\alpha$ formează molecula DR cu 18 specificităţi. DQA1 şi DQB1 codifică pentru lanţurile DQ$\alpha$ şi DQ$\beta$ care formează molecula DQ, iar DPA1 şi DPB1 lanţurile DP$\alpha$ şi DP$\beta$.

Genele de clasa III codifică pentru moleculele de complement prezente în ser, C2, C4, Bf fiind învecinate cu trei gene care codifică pentru proteinele de şoc termic (HSP70) care ar avea rol în prezentarea peptidelor de către moleculele MHC.

Către extremitatea distală faţă de centromer, sunt două gene care codifică pentru TNF$\alpha$ şi TNF$\beta$.

Urmează genele de clasa I (B, C, A) care codifică pentru lanţurile $\alpha$, o glicoproteină asociată cu $\beta$2-microglobulina. Gena B are 52 de alele, C - 11 alele iar A - 24 de alele. Gena E este slab exprimată.

PBA = Polipeptidul A1 a factorului XIII de coagulare;

GLO = glioxaloză - 1;

PGM3 = fosfoglucomutază - 3.

**Complexul HLA** este situat pe cromozomul 6 la om, având în componenţa sa regiunile HLA-A, HLA-B, HLA-C şi HLA-D. Regiunea HLA-D situată către centromer codifică pentru moleculele de clasa II-a şi are trei loci denumiţi DP, DQ şi DR. Iniţial, specificităţile acestor loci, adică moleculele sintetizate sub controlul genelor de la aceste nivele, au putut fi identificate serologic, motiv pentru care au fost denumite DR (D-related, adică în relaţie cu regiunea D). Către extremitatea telomerică sunt regiunile HLA-B, HLA-C şi HLA-A care codifică pentru moleculele de clasa I, cele mai polimorfe fiind regiunile HLA-A şi HLA-B cu 23 şi 49 de haplotipuri (haplotip = set de gene localizat pe un cromozom, care au o exprimare fenotipică unică). Locusul HLA-C are numai 8 halotipuri. Între HLA-D şi HLA-B sunt situate genele care codifică pentru moleculele de clasa III, adică pentru C2, C4, Slp şi factorul B al complementului (fig. 154).

Gena tipică HLA al clasei I are opt exoni, primul codificând pentru o secvenţă cu cca. 18 nucleotide urmat de codoni pentru leaderul hidrofob cu 24 de aminoacizi, responsabil de inserţia lanţului greu la membrana plasmatică. Exonii 2,3 şi 4 codifică pentru domeniile $\alpha_1$, $\alpha_2$ şi $\alpha_3$, ultimul fiind omolog cu regiunea constantă (C) a imunoglobulinelor şi având ca atribut funcţional, printre altele, şi pe cel de legare a lanţului $\beta$-microglobulină. Exonul 5 codifică pentru segmentul transmembranar iar 6, 7 şi 8 pentru cel citoplasmic (fig. 155).

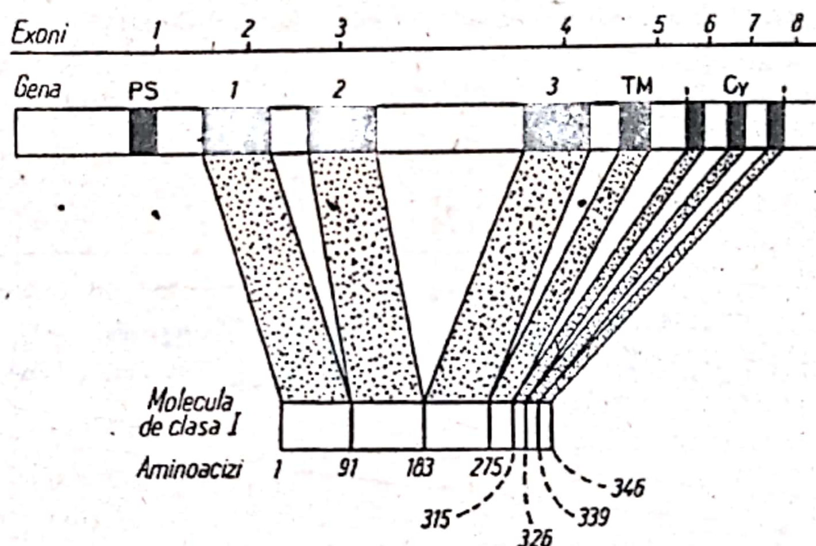



Fig.155. Reprezentarea schematică a organizării exonilor (pătratele negre) şi intronilor (spaţii albe) genei care codifică pentru sinteza moleculelor de clasa I HLA în relaţie cu secvenţa aminoacizilor din lanţul polipeptidic. PS = proteină semnal; Cy = segmentele domeniului intracitoplasmatic; TM = segmentul transmembranar (după R.J.Duquesnoy şi M. Trucco).

Genele care codifică lanţurile polipeptidice ale moleculelor de clasa II au de asemenea o organizare exon-intron care corespunde domeniilor structurale ale moleculei. Primul exon codifică pentru o secvenţă leader iar restul pentru domeniile $\alpha_1$ sau $\beta_1$, $\alpha_2$ sau $\beta_2$ etc. (fig 156).

În cazul genelor care controlează sinteza moleculelor de clasa III, în cursul evoluţiei, au fost păstrate cel puţin două tipuri distincte: unul cu genele care controlează sinteza C4, Slp şi hidrolazele 21 (21 OHA). Ca şi la şoarece, genele care codifică pentru moleculele de clasa III sunt inserate între cele ale moleculelor de clasa II (DR) şi clasa I, (BCA) cu excepţia faptului că, în sistemul HLA, toate genele clasei I ocupă loci spre extremitatea telomerică a cromozomului şi nu sunt

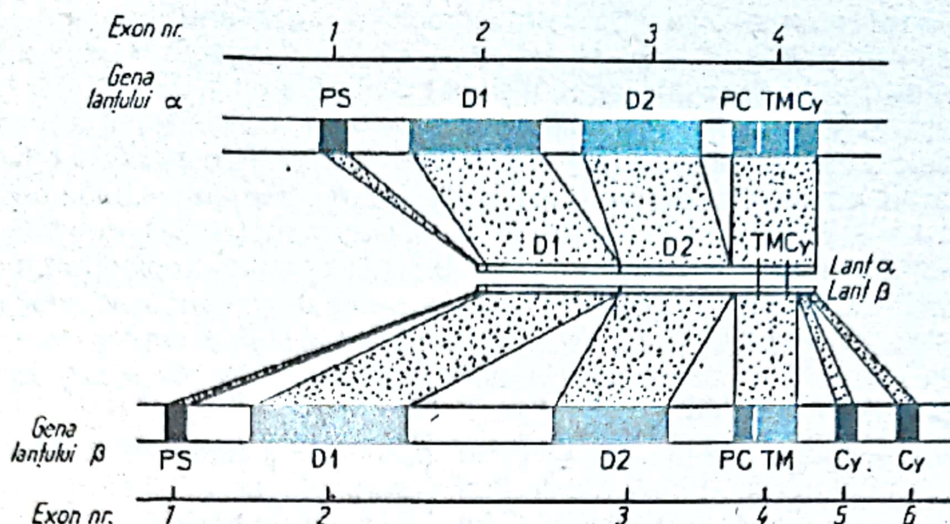



Fig.156. Exonii (pătratele negre) şi intronii (pătratele albe) genei care controlează lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ ale heterodimerului de clasa II. PS = proteina semnal; PC = peptida de conectare a domeniilor extracelulare (D1$\alpha$1 sau $\beta$1; D2$\alpha$2 sau $\beta$2) cu cele transmembranare (TM) şi intracitoplasmatice (Cy). În cazul lanţului $\alpha$ exonii care controlează domeniul citoplasmatic (Cy) nu sunt despărţiţi prin introni de cei care controlează sinteza segmentului transmembranar. Lanţul $\beta$, în cazul segmentului citoplasmatic Cy, formează două unităţi despărţite de introni (după R. Duquesnoy şi M. Trucco).

divizate ca la şoarece în loci situaţi atât spre extremitatea telomerică, cât şi spre cea centrometrică (fig. 157).

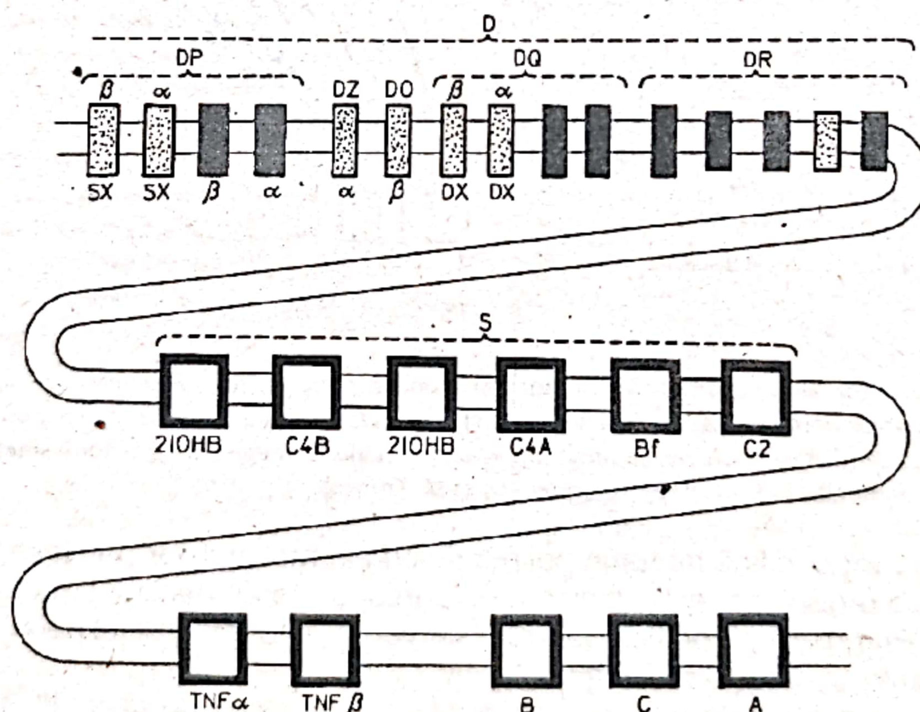



Fig.157. Harta genetică a complexului HLA de la nivelul cromozomului 6. Regiunea D are trei subregiuni (DP, DQ, DR) cu gene active (dreptunghiurile negre) şi cu pseudogene (dreptunghiurile punctate). La nivelul fiecărei subregiuni sunt gene care codifică pentru lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ ale moleculelor de clasa II. Între regiunea S (III) şi I (B, C, A), reprezentate prin pătrate albe cu marginile groase, sunt genele pentru TNF $\alpha$ şi $\beta$ (după I. Roitt şi col.).

Fiecare locus al genelor de la nivelul complexului HLA poate controla sinteza unui mare număr de specificităţi antigenice care pot fi detectate serologic. Datorită potenţialului de legare încrucişată, între genele de pe diverşi loci, posibilitatea de variaţie a specificităţilor este enormă. Din această cauză, pe lângă OMS, funcţionează un Comitet Internaţional care datorită ratei rapide a acumulărilor de cunoştinţe privind secvenţa ADN pentru genele şi alelele HLA, se întruneşte anual pentru a standardiza şi ordona cunoştinţele acumulate. La întrunirea "Comitetului pentru Nomenclatură HLA" din 1 VIII 1990, s-a stabilit nomenclatura pentru alelele şi specificităţile HLA, redată în tabelul 92.

*Tabelul 92*

**Nomenclatura factorilor pentru sistemul HLA**
**(după J.G. Bodmer şi col)**

| Regiunea | Alela HLA | Specificitatea |
|---|---|---|
| DP | DPA1 0101 | - |
| | DPA1 0102 | - |
| | DPA1 0103 | - |
| | DPA1 0201 | - |
| | DPB1 0101 | DPw1 |
| | DPB1 0201 | DPw2 |
| | DPB1 0202 | DPw2 |
| | DPB1 0301 | DPw3 |
| | DPB1 0401 | DPw4 |
| | DPB1 0402 | DPw4 |
| | DPB1 0501 | DPw5 |
| | DPB1 0601 | DPw6 |
| | DPB1 0801 | - |
| | DPB1 0901 | - |
| | DPB1 1001 | - |
| | DPB1 1101 | - |
| | DPB1 1301 | - |
| | DPB1 1401 | - |
| | DPB1 1501 | - |
| | DPB1 1601 | - |
| | DPB1 1701 | - |
| | DPB1 1901 | - |
| DQ | DQA1 0101 | - |
| | DQA1 0102 | - |
| | DQA1 0103 | - |
| | DQA1 0201 | - |
| | DQA1 0301 | - |
| DQ | DQA1 0601 | |
| | DQB10501 | DQw5 |
| | DQB1 0502 | DQw5 |
| | DQB1 0503 | DQw5 |
| | DQB1 0601 | DQw6 |
| | DQB1 0603 | DQw6 |
| | DQB1 0604 | DQw6 |
| | DQB1 0201 | DQw2 |
| | DQB1 0301 | DQw7 |
| | DQB1 0302 | DQw8 |
| | DQB1 0303 | DQw9 |
| | DQB1 0401 | DQw4 |
| | DQB1 0402 | DQw4 |
| DR | DRB1 0101 | DR1 |
| | DRB1 0102 | DR1 |
| | DRB1 0103 | DR' BR' |
| | DRB1 0501 | DRw15 |
| | DRB1 1502 | DRw15 |
| | DRB1 1601 | DRw16 |
| | DRB1 1602 | DRw16 |
| | DRB1 0301 | DRw17 |
| | DRB1 0302 | DRw18 |
| | DRB1 0401 | DR 4 |
| | DRB1 0402 | DR 4 |
| | DRB1 0403 | DR 4 |
| | DRB1 0404 | DR 4 |
| | DRB1 0405 | DR 4 |

| Regiunea | Alela HLA | Specificitatea |
|---|---|---|
| | DRB1 0408 | DR4 |
| | DRB1 1101 | DRw 11 |
| | DRB1 1102 | DRw11 |
| | DRB1 1103 | DRW11 |
| | DRB1 1104 | DRw11 |
| | DRB1 1201 | Drw12 |
| | DRB1 1301 | DRw13 |
| | DRB1 1302 | DRw13 |
| | DRB1 1303 | DRw13 |
| | DRB1 1401 | DRw14 |
| | DRB1 1402 | DRw14 |
| DR | DRB1 0701 | DR7 |
| | DRB1 0702 | DR7 |
| | DRB1 0801 | DRw8 |
| | DRB1 0802 | DRw8 |
| | DRB1 0803 | DRw8 |
| | DRB1 091 | DR9 |
| | DRB1 1001 | DRw10 |
| | DRB3 0101 | DRw52a |
| | DRB3 0201 | DRw52b |
| | DRB3 0202 | Drw52b |
| | DRB3 0301 | Drw52c |
| | DRB4 0101 | DRw53 |
| | DRB5 0101 | DRw15 |
| | DRB5 0102 | DRw15 |
| | DRB5 0201 | DRw16 |
| | DRB5 0202 | B7 |
| | B 0701 | B7 |
| | B 0702 | B8 |
| | B 0801 | B13 |
| | B 1301 | B13 |
| B | B 1302 | B13 |
| | B 1401 | B14 |
| | B 1402 | Bw65 |
| | B 1501 | Bw 62 |
| | B 1801 | B 18 |
| | B 2701 | B 27 |
| | B 2702 | B 27 |

| Regiunea | Alela HLA | Specificitatea |
|---|---|---|
| | B 2703 | B 27 |
| | B 2704 | B 27 |
| | B 2705 | B 27 |
| | B 2706 | B 27 |
| | B 3501 | B 35 |
| | B 3701 | B 37 |
| | B 3801 | B 38 |
| | B 3901 | B 39 |
| B | B 4001 | Bw 60 |
| | B 4002 | B 40 |
| | B 4101 | Bw 41 |
| | B 4201 | Bw 42 |
| | B 4401 | B 44 |
| | B 4402 | B 44 |
| | B 4601 | Bw46 |
| | B 4701 | Bw 47 |
| | B 4901 | B 49 |
| | B 5101 | B 51 |
| | B 5201 | Bw 52 |
| | B 5701 | Bw42 |
| | B 5801 | Bw 57 |
| | Cw 0101 | Cw 1 |
| | Cw 0201 | Cw 2 |
| | Cw 0202 | Cw 2 |
| | Cw 0301 | Cw 3 |
| | Cw 0501 | Cw 5 |
| C | Cw 0601 | Cw 6 |
| | Cw 0701 | Cw 7 |
| | Cw 1101 | Cw 11 |
| | Cw 1201 | - |
| | Cw 1301 | - |
| | Cw 1401 | - |
| | A 0101 | A 1 |
| | A 0201 | A 2 |
| A | A 0202 | A 2 |
| | A 0203 | A 2 |
| | A 0204 | A 2 |
| | A 0205 | A 2 |

| Regiunea | Alela HLA | Specificitatea | Regiunea | Alela HLA | Specificitatea |
|---|---|---|---|---|---|
| | A 0206 | A 2 | | A 2901 | A 29 (w19) |
| | A 0207 | A 2 | | A 3001 | A 30 (w19) |
| | A 0208 | A 2 | | A 3101 | A 31 (w19) |
| | A 0210 | A 2 | | A 3201 | A 32 (w19) |
| A | A 0301 | A 3 | A | A 3301 | Aw 33 (w19) |
| | A 0302 | A 3 | | A 6801 | Aw 68 |
| | A 1101 | A 11 | | A 6802 | Aw 68 |
| | A 2401 | A 24 | | A 6901 | Aw 69 |
| | A 2501 | A 25 | | | |
| | A 2601 | A 26 | | | |

Cu această ocazie, pe baza secvenţei ADN a fost stabilită existenţa a 25 de alele HLA-A, 32 HLA-B şi 11 HLA-C, 14 alele DPA-1, 19 DPB-1 etc. Cele încă insuficient definite sunt notate cu *w*. Observaţiile clinice şi de laborator, bazate mai mult pe date statistice, au semnalat o asociere frecventă a unor antigene HLA cu anumite boli (tabelul 93). Dintre toate, se pare că cea mai justificată este asocierea specificităţii B27 cu spondilita anchilozantă, aproape 90% din pacienţi prezentând această specificitate alotipică. În alte maladii, ca de exemplu în scleroza multiplă, boala Graves etc., asocierea cu anumite specificităţi este minoră şi, ca atare, discutabilă.

*Tabelul 93*

**Boli asociate cu unele antigene HLA (după I. Roitt)**

| Boala | Antigenul | Risc relativ | Boala | Antigenul | Risc relativ |
|---|---|---|---|---|---|
| Spondilita anchilozantă | B 27 | 87,8 % | Psoriazis | A 1<br>B 13 | 2,1 %<br>8,7 % |
| Maladia Reiter | B 27 | 35,9 % | | Bw 37<br>Cw 6 | 8,1 %<br>4,3 % |
| Artrita reumatoidă | DRw 4 | 4,0 % | Boala Adison | Dw 3 | 8,8 % |
| Scleroza | A 3 | 1,8 % | Boala | B 8 | 2,5 % |
| multiplă | B 7 | 2,0 % | Graves | Bw 35 | 5,0 % |
| | Bw 2 | 1,9 % | | Bw 3 | 5,5 % |
| | DRw 2 | 3,8 % | Hemocromatoza | A 3 | 9,0 % |
| Miastenia | B 8 | 3,4 % | Hepatita | B 8 | 9,2 % |
| gravis | DRw 3 | 3,0 % | cronică | DRw 3 | 4,6 % |

Acum este pe deplin dovedit faptul că genele MHC sunt membre ale superfamiliei de gene imunoglobulinice cu rol în funcţiile de recunoaştere atât a structurilor proprii cât şi a celor străine de organism. Proteinele codificate de către ele au o complexitate de atribute biologice, responsabilitatea lor în in-

dividualizarea din punct de vedere antigenic a fiecăruia dintre noi fiind de importanţă capitală.

În exprimarea antigenelor controlate de către sistemul H-2 murin sau HLA uman, pe lângă asemănările care merg până la identitate, există şi unele deosebiri. Astfel, dacă genele sistemului HLA şi-au păstrat poziţia ancestrală, în sensul că locii celor care controlează sinteza antigenelor de clasa II sunt situate la o extremitate a complexului, cele ale sistemului H-2, respectiv regiunea K, şi-au pierdut poziţia telomerică.

Există o diferenţă în distribuţia tisulară a antigenelor de clasa I şi II, în sensul că, la om, dar nu la şoarece, antigenele de clasa II sunt exprimate şi pe limfocitele *T* activate. Dar, atât la om cât şi la alte specii antigenele MHC intră în componenţa complexului trimolecular receptor pentru antigen+antigen+MHC, realizând recunoaşterea epitopului de către limfocitul *T* "sub restricţie MHC". Ele conferă statut de "reactant" sau "nereactant" diferiţilor indivizi faţă de un anumit antigen şi participă efectiv la selecţia pozitivă şi negativă a limfocitelor.

În afară de importanţa cunoştinţelor fundamentale privind rolul biologic al sistemului MHC, acestea au şi aplicaţii practice, în sensul precizării asocierii lui cu unele boli, al înţelegerii şi stăpânirii mecanismelor de rejecţie a transplantelor de organ, expertizei paternităţii etc.

## BAZA GENETICĂ PENTRU DIVERSITATEA UNITĂŢILOR DE RECUNOAŞTERE A ANTIGENULUI

### CONTROLUL GENETIC AL SINTEZEI IMUNOGLOBULINELOR

Caracteristica principală a efectorilor sistemului imun o reprezintă diversitatea posibilităţilor lor de recunoaştere, graţie cărora organismul poate face distincţia dintre structurile lui proprii, pe care le tolerează, şi cele non-proprii, pe care le respinge. La nivel de anticorp, recunoaşterea se realizează prin fixarea suprafeţei interioare a situsului combinativ, care are o formă complementară antigenului (de unde şi denumirea de "paratop"), la epitop, diversitatea epitopilor existenţi în natură impunând aceeaşi diversitate şi la nivelul paratopilor. Dar, diversitatea anticorpilor nu se manifestă numai la nivelul situsului combinativ, ci şi la nivelul altor regiuni ale moleculei, cu funcţii biologice bine definite. De exemplu, fragmentul *Fc* al IgE se leagă la receptorul *Fc* de pe mastocite, pe când *Fc* de la IgG, pe receptorul *Fc* de pe macrofage, celule *K* etc. Dacă se ia în considerare şi diversitatea de specificităţi izotipice, alotipice, idiotipice, atunci enorma diversitate a imunoglobulinelor devine şi mai evidentă. Se estimează că un individ produce mai multe tipuri de molecule de imunoglobulină decât tipurile de molecule de proteină care alcătuiesc întregul său organism sau, altfel spus, produce mai multe tipuri de anticorp decât numărul genelor pe care le are în genom.

Prima teorie care încerca să explice această enormă diversitate a anticorpilor a fost cea a "lanţurilor laterale" emisă de P. EHRLICH în anul 1900. Conform acestei teorii, anticorpii sunt constituenţi preformaţi care se găsesc la nivelul membranei celulare ca receptori de membrană. Combinarea antigenului cu receptorii preformaţi de pe limfocit activează celula şi o determină să "fabrice" un număr sporit de receptori care se desprind de pe membrană şi ajung în circulaţie. P. EHRLICH s-a apropiat foarte mult de adevăr, deşi considera că aceeaşi celulă are receptori cu specificităţi de anticorp diferite, fapt care nu corespunde realităţii. El a anticipat

însă atât teoria selecţiei clonale, cât şi ideea că sistemul imun poate genera receptori cu mult înainte de a veni în contact cu antigenul, receptori care au structura de anticorpi. Deci, la nivel celular anticorpii sunt preexistenţi.

K. LANDSTEINER constată însă că celulele pot produce anticorpi şi faţă de antigene artificiale, care nu există în natură. Această constatare a pus sub semnul întrebării valabilitatea teoriei lui EHRLICH, deoarece era greu de imaginat faptul că organismul poate să-şi menţină prin selecţie naturală gene care să controleze şi sinteza anticorpilor faţă de compuşi artificiali. Ca atare, s-au dezvoltat "teoriile instructive", conform cărora anticorpii sunt produşi sub influenţa antigenului care nu selecţionează moleculele preformate ci le "instruieşte" formarea, acţionând ca o matriţă care imprimă pe un material moale amprenta propriei sale conformaţii. Rezultă molecula de imunoglobulină cu o formă complementară antigenului.

P.EHRLICH a fost autorul "teoriei selective" iar K.LANDSTEINER al celei "instructive" a sintezei imunoglobulinelor. Conform "teoriei selective", limfocitele au gata pregătiţi receptorii de membrană care sunt recunoscuţi specific de către antigene, recunoaştere care duce la desprinderea lor de pe celulă şi trecerea în circulaţie, sub formă de molecule libere de anticorp.

"Teoria instructivă" susţinea că nu există receptori preformaţi, ei fiind sintetizaţi sub influenţa antigenului care acţionează asupra celulei ca o "matriţă" asupra unui material moale, lăsând "amprenta" asupra acestuia, "amprentă" care nu ar fi altceva decât anticorpul. Diferenţa dintre aceste două teorii ar putea fi comparată cu situaţia în care se găseşte cineva care doreşte să-şi procure un costum de haine. El poate să le ia din magazin, unde le găseşte cusute gata, trebuind doar să-şi aleagă (selecteze) măsura potrivită lui, sau poate merge la croitor pentru a i se lua măsura corpului (instructiv) şi a-i coase hainele după aceasta.

Progresele biologiei moleculare şi imunologiei au infirmat validitatea teoriilor instructive, N.JERNE şi M.BURNET readucând în actualitate conceptul selectiv al formării anticorpilor emis de P. EHRLICH la începutul secolului. A fost emisă "teoria selecţiei clonale", conform căreia populaţia limfocitară este alcătuită dintr-un număr mare de clone, celulele fiecărei clone având un receptor unic pentru antigen; fiecare celulă produce numai un tip de moleculă de imunoglobulină, antigenul selectând şi stimulând celula care poartă imunoglobuline cu specificitate de anticorpi faţă de el.

Dar cum se poate explica totuşi enorma diversitate a moleculelor de imunoglobulină? Două teorii încearcă să explice mecanismele care stau la baza generării diversităţii: teoria "liniei germinative" şi "teoria mutaţiei somatice".

Conform *teoriei liniei germinative*, ar exista în genom câte o genă pentru fiecare specificitate de anticorpi. Ar fi deci gene care ar codifica pentru regiunile *V* şi gene care ar codifica pentru regiunile *C* ale lanţului *L* sau *H*. Dar un lanţ *L* are o regiune *V* şi una *C*, iar un lanţ *H* are o regiune *V* şi trei sau patru regiuni *C*. Cum este posibil ca genele care codifică pentru *V* să fie atât de variabile, iar cele care codifică pentru *C*, deşi aproximativ egale cu cele *V*, să rămână constante, neinfluenţate de diverşi factori mutaţionali din mediu? S-a încercat rezolvarea acestei dileme acceptându-se ideea că regiunea *V* este codificată de un număr mare de gene, iar regiunea *C* de o genă sau un număr mic de gene.

*Teoria mutaţiilor somatice* consideră că este imposibil ca genomul să conţină un număr atât de mare de gene care să poată acoperi întreaga diversitate a moleculelor de imunoglobulină. Ea propune intervenţia unor mutaţii care fac ca un număr mic de gene din genom să genereze diversificări mari.

În prezent sunt trei mecanisme prin care se încearcă explicarea diversităţii anticorpilor, respectiv generarea diferitelor regiuni $V_H$ sau $V_L$. Aceste mecanisme ar fi:

1. Existenţa unui număr mare de gene separate, fiecare dintre ele codificând pentru un anumit segment de lanţ $V_H$ sau $V_L$ (teoria liniei germinative);

2. Existenţa unei gene *V* primordiale care, în timpul ontogeniei limfocitului *B*, suferă mutaţii ce produc gene diferite exprimate la nivelul diferitelor clone de celule (teoria mutaţiei somatice);

3. Existenţa unui număr de segmente de gene de unire *(J)* care se recombină în timpul ontogeniei limfocitului *B* cu o parte principală a genei unice *V*. Diferitele segmente de gene vor codifica diferite segmente de lanţ polipeptidic (ipoteza recombinaţiilor somatice).

Se pare că toate aceste trei mecanisme intervin în generarea diversităţii anticorpilor.

## EVENIMENTELE CARE CONTROLEAZĂ SINTEZA MOLECULEI DE IMUNOGLOBULINĂ

În linii mari, secvenţa evenimentelor care controlează sinteza moleculei de imunoglobulină este următoarea:

a) sinteza lanţurilor polipeptidice (cronologic, sinteza lanţurilor *H* precede sinteza celor *L*);
b) asamblarea moleculelor de imunoglobulină;
c) adiţia componentelor glucidice;
d) polimerizarea şi eliminarea moleculelor de imunoglobulină;
e) comutarea sintezei moleculelor de imunoglobulină.

**Controlul genetic al sintezei lanţurilor imunoglobulinelor.** La nivelul liniei germinative există trei grupe de gene, dintre care două controlează sinteza lanţului *L*, cu specificităţile $\lambda$ şi k, iar a treia pe cea a lanţului *H*. La om, genele pentru lanţul $L_k$ sunt localizate pe cromozomul 2, cele pentru $L\lambda$ pe cromozomul 22, iar cele pentru lanţul *H* pe cromozomul 14. În fiecare grupă există *transloconi* cu gene care codifică pentru regiunea *V* şi cu gene care codifică pentru regiunea *C* a lanţului. Aşadar, în componenţa fiecărui translocon (şir de gene care codifică pentru un lanţ polipeptidic complet) există cistroni diferiţi cu gene care codifică pentru o anumită secvenţă a aminoacizilor dintr-un lanţ polipeptidic (tabelul 94). Fiecare genă *V* codifică pentru regiunea variabilă, de la reziduul nr. 1 până la poziţia 95 - 96 şi pentru 4 reziduuri de aminoacizi dintr-o "peptidă semnal". Restul de 15 - 18 reziduuri ale acestui peptid este codificat de un segment mic L (leader). Ultimii 12 - 13 aminoacizi ai regiunii $V_L$ şi $V_H$ sunt codificaţi de un segment de "joncţiune" *(J)* care face legătura cu segmentele constante codificate de gena *C*.

*Tabelul 94*

**Transloconi şi cistroni cu gene care codifică pentru molecule de imunoglobulină**

| Lanţ | Transloconi | Cistroni | |
|---|---|---|---|
| | | V | C |
| *L* | Kappa (k)<br>Lambda ($\lambda$) | $V_k$<br>$V\ \lambda_1$; $V\ \lambda_2$ | $C_k$<br>$C\ \lambda_1$; $C\ \lambda_2$ |
| *H* | Heavy | $V_H$ | $C_H$ ($\mu, \gamma, \alpha, \delta, \varepsilon$) |

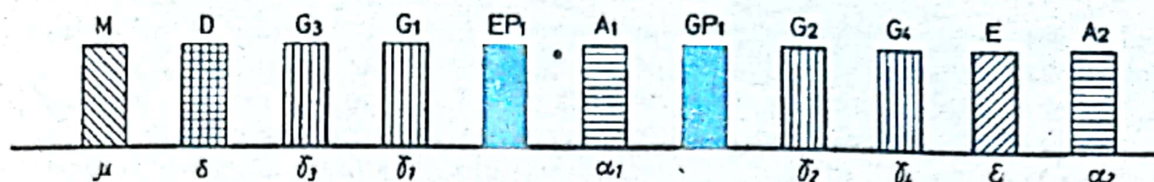



Fig.158. Poziţia genelor care codifică pentru clasele şi subclasele de imunoglobuline umane. Dreptunghiurile negre sunt nefuncţionale.

În procesul de sinteză şi diferenţiere, prin translocaţii simultane sau succesive, porţiunile de lanţ codificate de către genele *V* se pot insera la secvenţele codificate de genele *C*, astfel că o moleculă de imunoglobulină, deşi aparţine unui izotip unic, poate avea un spectru extrem de larg de specificităţi idiotipice. Altfel spus, o moleculă poate să aparţină la clase diferite, deci cu regiuni *C* diferite ale lanţului *H*, dar să aibă specificitate de anticorp unică. Aşadar, genele imunoglobulinice sunt asamblate din segmente discontinue din linia germinativă, care sunt juxtapuse în timpul dezvoltării limfocitului *B*.

La om, genele care codifică pentru sinteza imunoglobulinelor se înşiruie în ordinea M-D-G3-G1-EP1-A1-GP1-G2-G4-E-A2; genele EP1 şi GP1 fiind pseudogene nefuncţionale (fig.158). Fiecare genă posedă mai mulţi exoni corespunzând domeniilor $C_H1$, $C_H2$ şi $C_H3$ ale imunoglobulinelor IgG, IgA şi IgD şi $C_H1$-$C_H4$ în cazul celor IgM şi IgE.

*Sinteza lanţului Lλ* este controlată de către un număr redus de gene care codifică pentru cei cca. 95 de aminoacizi ai regiunii *V*, de către gene *J* care codifică pentru restul de 13 aminoacizi din *V* şi de către o genă C care codifică pentru cei cca. 108 aminoacizi ai regiunii *C* (fig. 159). La nivelul liniei germinative, genele *V*

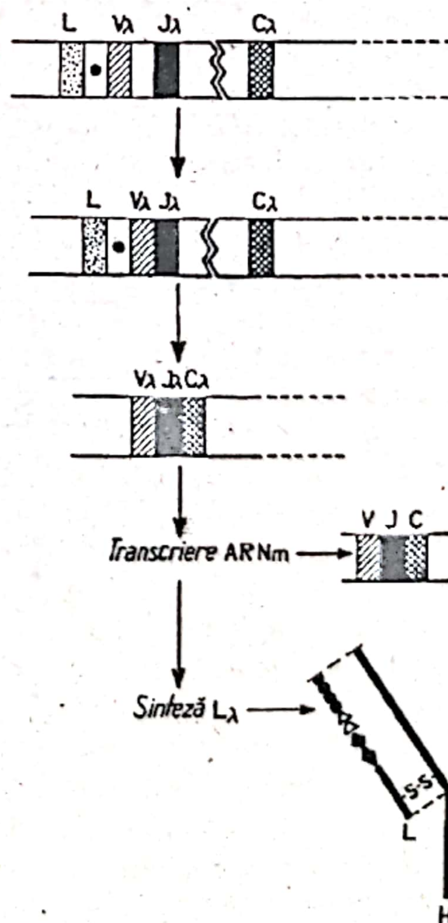



Fig.159. Controlul genetic al sintezei lanţului Lλ. La nivelul liniei germinative, genele Vλ şi Jλ sunt distanţate şi precedate de nişte nucleotide care codifică sinteza unui fragment al lanţului L alcătuit din cca. 17-20 de reziduuri de aminoacizi (leader hidrofobic). Genele operaţionale sunt separate de introni care sunt eliminaţi prin deleţie, permiţând astfel unirea, iniţial a genelor VλJλ şi, ulterior, a acestora cu C. Urmează transcrierea informaţiei în ARNm şi sinteza lanţului L (după O.G. Bier şi col.).

şi $J$ sunt distanţate, apropiindu-se unele de altele în cursul maturării funcţionale a limfocitului. Genele $V$ sunt precedate de către un număr redus de nucleotide, care codifică sinteza unui fragment constituit din 17 - 20 de aminoacizi din lanţul $L$, numit "leader hidrofobic" (conductor hidrofobic sau "peptida semnal"), important pentru transportul în cavitatea reticulului endoplasmatic. După transport, peptida este eliminată de o peptidază.

Toate genele imunoglobulinelor (ca de altfel şi celelalte gene) sunt alcătuite din porţiuni de ADN care codifică (exoni) şi din porţiuni "mute" care nu codifică (introni), dar care separă exonii. Între grupele de gene $LVJ$ se interpun introni care le separă. În cursul maturării funcţionale, deci la trecerea de la forme de limfocit $B$ de memorie la plasmocit, intronul dintre $V$ şi $J$ este eliminat (deleţie), astfel încât $V\lambda$ se uneşte cu $J\lambda$, formând complexul $VJ$. Acest complex fuzionează cu $C\lambda$, realizându-se translocarea $V\lambda J\lambda C\lambda$ care va înscrie informaţia în ARNm, iar acesta, la rândul său, o va traduce la nivelul ribozomilor în vederea sintezei lanţului $L\lambda$. Numărul relativ mic de gene care controlează sinteza lanţului $L\lambda$ ar explica proporţia mică de molecule de imunoglobulină prezente în circulaţie la şoarece (cca. 5%) şi chiar şi la om (cca. 40%) care au astfel de lanţuri în structura lor.

*Sinteza lanţurilor* $L_K$. Numărul genelor $V_K$ care codifică pentru 95 de aminoacizi din domeniul variabil $V_L$ este mai mare decât cel al genelor $V\lambda$ (cca. 300-600 $V_K$ în comparaţie cu câteva gene $V\lambda$). De asemenea există nu unul, ci 5 segmente $J$, dintre care numai 4 sunt active şi codifică pentru restul de 13 aminoacizi din $V_L$. Genele sunt despărţite de introni, asamblarea $VJC$ realizându-se prin deleţie şi unire (fig. 160). În linia germinativă, genele $V_K$ şi $J_K$ sunt îndepărtate şi despărţite prin introni, pentru ca în cursul maturării limfocitului să fie aduse în apropiere.

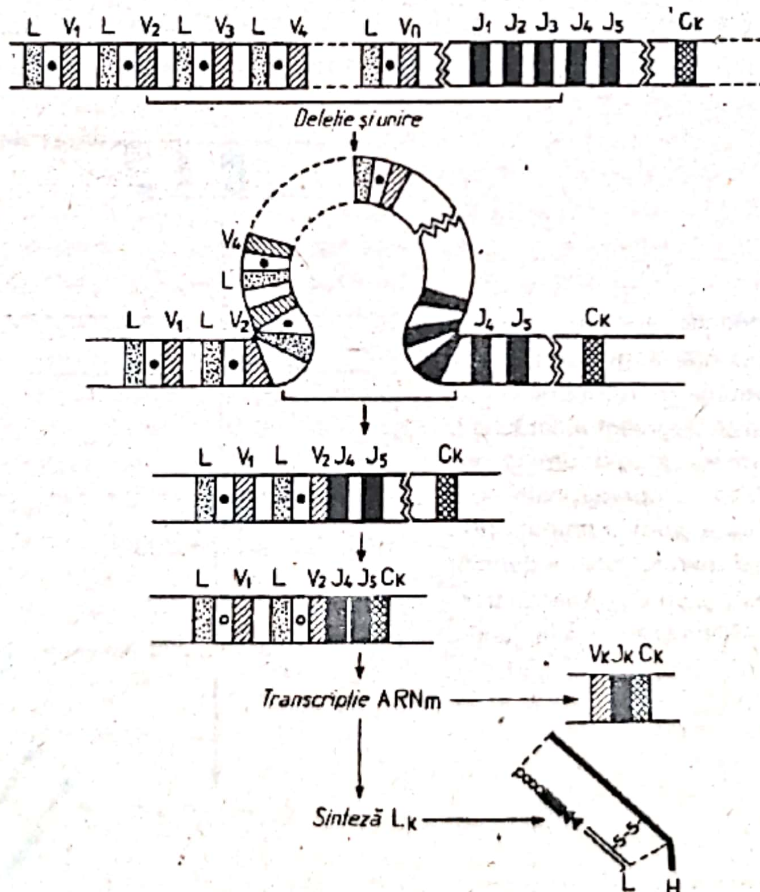



Fig.160. Controlul genetic al sintezei lanţului $L_k$. Numărului genelor $V_k$ şi al segmentelor J este mai mare decât la lanţul $L\lambda$. Transcrierea informaţiei la nivelul ARNm şi sinteza lanţului se realizează prin deleţia intronilor şi unirea exonilor (după O.G. Bier şi col.).

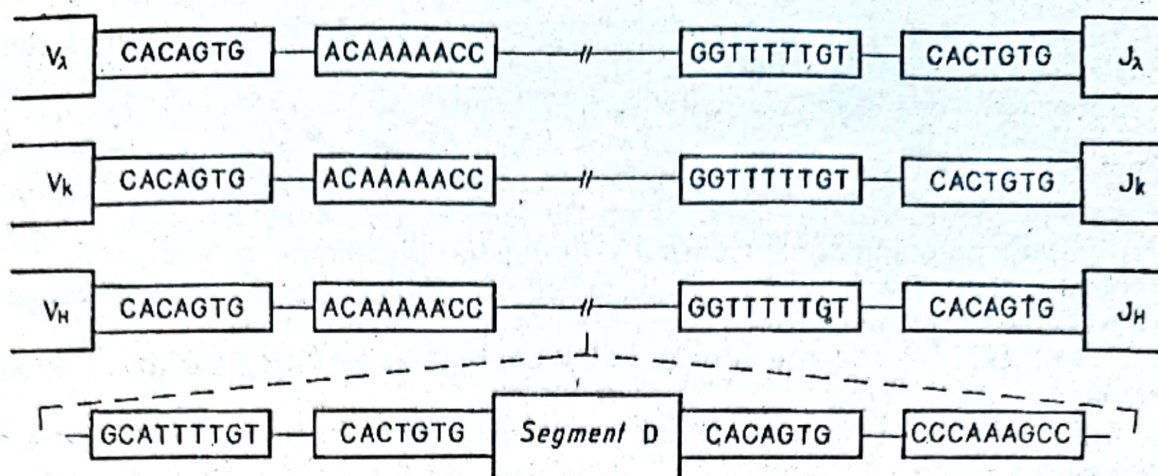



Fig.161. Reprezentarea schematică a semnalelor de joncţiune $V\lambda$ - $J\lambda$, $V_k$ - $J_k$ şi $V_H$ - D - $J_H$. A=alanină; C=cisteină; G=glicină; T=treonină. (după M.P. Lefranc şi G. Lefranc).

Ansamblul *VJC* este transcris într-un ARN premesager, apoi secvenţele ARN care corespund intronilor şi secvenţelor $J_k$ "mute" sunt excizate, realizându-se un "mARN matur" care este "tradus" la nivel ribozomal în lanţ *L*. Rearanjamentul *V-J* se face graţie semnalelor de joncţiune *heptamer-nonamer* recunoscute de "recombinaze".

Fiecare genă *V* este urmată de un heptamer cu secvenţa *CACAGTG* şi un nonamer *ACAAAAACC* separate prin 12 nucleotizi. Segmentele *J* sunt precedate de nonamerul *GGTTTTTGT* şi de un heptamer *GACTGTG* separate de 23 de nucleotizi (fig. 161).

Numărul mare de gene $V_k$ conferă o posibilitate sporită de variabilitate a $V_L$, posibilitate multiplicată de 4 ori datorită existenţei a 4 tipuri de secvenţe *J* (600 $V_k$. 4*J* = 2 400). Acest fapt ar explica proporţia crescută de molecule de imunoglobulină, care au în componenţa lor lanţuri $L_k$ (cca. 95%) şi posibilitatea sporită a acestor lanţuri de a contribui la variabilitatea situsurilor combinative ale moleculelor.

*Sinteza lanţurilor H.* Cistronul $V_H$ conţine un număr mare de gene, separate de introni şi precedate de secvenţa *L*. În componenţa $V_H$ sunt nu două, ci trei tipuri diferite de secvenţe de gene: unul conţine cca. 400 de gene *V*, altul 20 de *D* care codifică pentru a treia regiune hipervariabilă şi al treilea tip, pentru 4 gene *J*. În "linia germinativă" (configuraţia genică nearanjată), semnalele de joncţiune heptamer-nonamer ale $V_H$ şi $J_H$ sunt separate de 23 de nucleotide, iar cele ale segmentului *D* de 12 - 13 nucleotide. Pentru sinteza unui lanţ *H*, în precursorii celulelor *B* sunt necesare două rearanjări, şi anume: a) joncţiunea unui segment J la un segment D şi b) joncţiunea unui segment $V_H$ la ansamblul JD.

În prima etapă a activării, segmentele *D* şi *J* sunt aliniate prin intervenţia unei "exonucleaze" care taie heptamerul adiacent secvenţelor, eliminându-l sub formă de "buclă de excizie". Exonucleaza acţionează asupra punctelor de tăiere, o dezoxinucleotidil-transferază terminală adaugă dezoxinucleotizii, o ADN-polimerază replică bazele neadăugate şi o ligază definitivează joncţiunea. Datorită existenţei segmentului *D* (de diversitate) şi unui număr mare de gene *V*, combinaţia *VDJ* poate controla sinteza unui număr mare de lanţuri *H* cu diferite specificităţi. Ar fi, după unii, cca. 400 *V* • 20 *D* • 4 *J* = 32 000 de posibilităţi de variaţie pentru $V_H$. După alţii, ar fi cca. 80 *V* şi 50 *D*.

Dar situsul combinativ al unei molecule este alcătuit şi din $V_L$, aşa că, teoretic, în combinaţia $V_H+V_K$ ar fi 600 $V_K$ • 4 $J_K$ = 2 400 • 32 000 = 7,68 • $10^7$ posibilităţi de formare a diferitelor tipuri de situs combinativ.

Potenţialul de variaţie este însă mult mai mare, deoarece evenimentele translocaţionale care duc la unirea genelor *VJ* sau a celor *VDJ* pot varia uşor, realizând aşa-zisa "variabilitate în flexibilitatea de legare". Mai mult, mutaţiile somatice spontane care intervin în cursul diferenţierii limfocitelor şi care conduc la codificarea diferită a unui aminoacid în secvenţa lanţului polipeptidic contribuie şi ele la sporirea variabilităţii.

În esenţă, diversitatea considerabilă a regiunilor variabile ale imunoglobulinelor s-ar explica prin:

a) Existenţa unui număr mare de gene *V* care codifică pentru diferite segmente variabile;

b) Posibilitatea unor combinaţii multiple *VJ*;

c) Existenţa de recombinări intergenice în familia genelor *V*;

d) Realizarea unei mari variabilităţi la locul de recombinare;

e) Realizarea de modificări în poziţia aminoacizilor date de mutaţiile somatice punctiforme, cu referire specială la genele *V* şi *J*.

În acest mod, o cantitate relativ mică de informaţie genetică existentă în linia germinativă poate controla un număr uriaş de molecule cu diverse specificităţi de anticorp.

Pentru $C_H$, codifică de trei sau patru ori mai multe gene decât pentru $C_L$. Diferenţa este explicabilă deoarece $C_H$ este de 3 sau 4 ori mai lung decât $C_L$. De exemplu, în genomul şoarecelui, imediat după genele *J* urmează genele care codifică pentru $C_H$ în ordine $\mu$, $\delta$, $\gamma$3, $\gamma$1, $\gamma$2b, $\gamma$2a, $\varepsilon$ şi $\alpha$ . În realitate, ordinea este mai complexă, deoarece există gene care codifică pentru fiecare domeniu constant al lanţului, cum ar fi de pildă $C\mu$1, $C\mu$2 etc. (fig. 162). Deci, domeniul *V* al

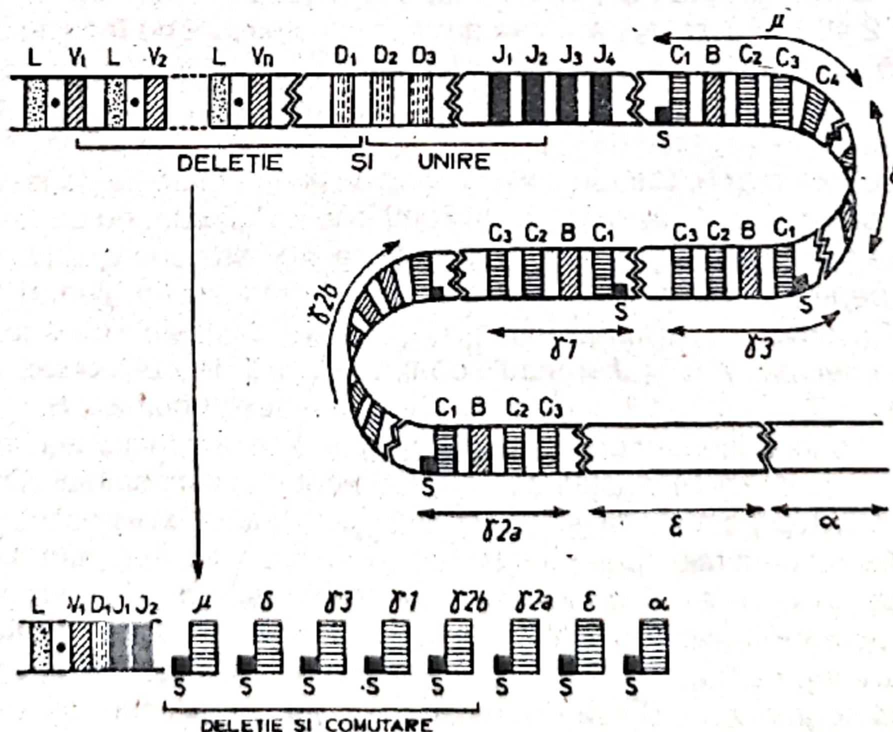



Fig.162. Sinteza lanţului H este controlată de către un număr mare de gene V, patru gene J şi 20 de gene D care codifică pentru lanţuri cu diferite specificităţi de recunoaştere. Şi numărul genelor care codifică pentru domeniile constante (C) ale lanţului este mai mare (după O.G. Bier şi col.).

lanţurilor *H* este creat prin unirea combinatorială a trei tipuri de gene *(V, D, J)*, fapt care permite o mai mare variabilitate *V* a lanţului *H* în comparaţie cu *V* a lanţului *L*. Acelaşi complex genic *VDJ* poate fi exprimat în comuniune cu orice grup de gene din regiunea *C* a lanţului *H*. Genele *J* sunt situate în vecinătatea imediată a genelor $\mu$, astfel încât complexul de gene *VDJ* este asamblat mai întâi cu $C\mu$. Aşa se explică de ce primii anticorpi şi primii receptori de membrană care apar aparţin clasei IgM. Ca şi în cazul genelor care codifică pentru lanţul $L\lambda$ sau $L_k$, în genomul liniei germinative genele *VDJ* sunt îndepărtate unele de altele. În cursul maturării limfocitului, genele *V* şi *D* se apropie de una din genele *J* cu excizia celorlalte *J*, formând complexul *VDJ* care, iniţial, va fi exprimat cu genele $\mu$ şi $\delta$, pentru ca ulterior să poată fi translocat în aşa fel încât să se lege lângă oricare altă genă *C*, conducând la exprimarea lanţului *H* respectiv ($VDJ\,\gamma$, $VDJ\,\varepsilon$, $VDJ\,\alpha$).

Din aceste date rezultă că asamblarea aminoacizilor şi înşiruirea lor în lanţul polipeptidic începe dinspre extremitatea $NH_2$ terminală către extremitatea COOH terminală a acestuia.

Genele lanţului *H* şi *L* au două regiuni importante din punct de vedere funcţional: una este regiunea "de promovare" (promotor) sau de "iniţiere" care iniţiază transcrierea, iar alta este de "amplificare" (enhancer) localizată în intronul *J-C* şi care intră în funcţie numai după rearanjarea *VDJ*, ca urmare a reducerii distanţei dintre promotor şi amplificator. Promotorul conţine octamerul *ATGGAAAT* asociat cu ARN nuclear iar amplificatorul, prezent numai pe limfocitele *B* mature, este un factor nuclear denumit NF - kB care se leagă la secvenţa *GGGACTTTCC* de la nivelul diferitelor gene, care nu aparţin numai limfocitelor *B* dar şi unor virusuri (HIV, $SV_{40}$) sau chiar şi genelor care controlează sinteza antigenelor MHC de clasa I. NF - kB este controlat şi reglat de către un factor citoplasmatic care-l recunoaşte şi-i inhibă activitatea. Rearanjarea segmentelor genice ale imunoglobulinelor trebuie să aibă loc înaintea transcrierii pentru asamblarea unităţii funcţionale *VDJ*, fiind necesare şi pentru efectuarea comutării clasei. Exprimarea unei rearanjări genice $\mu$ induce rearanjarea ulterioară a genei $V_H$, fiind clar că exprimarea formei membranare a lanţului $\mu$ este un moment critic pentru activarea aranjamentelor genei $L_k$ şi finisarea rearanjării ulterioare ale $V_H$ (fig. 163). Regiunea de comutare (*S*, dintre exoni, neredată în text) este mediată de o "recombinază" care nu este specifică pentru *B* şi care ar fi sub controlul unor factori necunoscuţi, printre care şi o limfokină elaborată de către limfocitul *T*.

De altfel, în recombinarea *VDJ* sunt implicate "recombinazele *VDJ*" . Au fost identificate două gene care, atunci când se exprimă simultan, pot genera "activitatea recombinazică *VDJ*" la toate tipurile de celule, nu numai la cele ale sistemului imun. Aceste gene, care codifică pentru recombinaza *VDJ*, sunt "gene de activare a recombinazei" (RAG1 şi RAG2 = recombinase activation genes).

**Asamblarea moleculelor de imunoglobulină.** Lanţurile *H* şi *L* sunt sintetizate la nivelul ribozomilor din plasmocite, mărimea acestora fiind direct proporţională cu lungimea lanţului sintetizat. De exemplu, lanţurile *H* sunt sintetizate în cca. 75 de secunde de către poliribozomi formaţi din 16 - 18 unităţi ribozomale, iar lanţurile *L*, în cca. 30 de secunde, de către poliribozomi formaţi din 7 - 8 unităţi. Un plasmocit eliberează cca. 1 000 de molecule de anticorpi într-o secundă, o moleculă de imunoglobulină fiind sintetizată şi asamblată în cca. 2 minunte. Sunt două modalităţi diferite de asamblare a lanţurilor în molecule, specifice diferitelor clase de imunoglobulină: fie că iniţial se leagă între ele ambele lanţuri *H*, după care se ataşează succesiv lanţurile *L*, fie că se leagă câte un lanţ *L* la lanţul *H*, după care

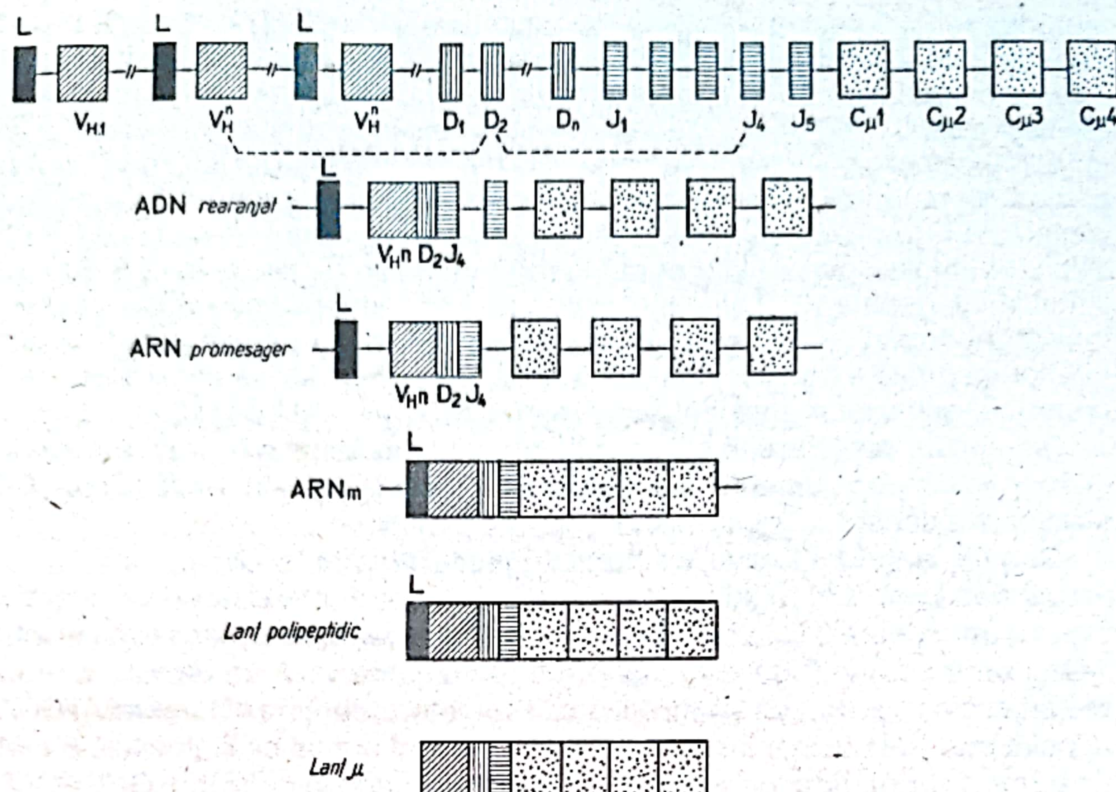



Fig.163. Transcrierea ansamblului $V_H$ - D - $J_H$ - $C_H$ şi maturarea ARNm. Un segment D se uneşte cu unul J, după care o genă $V_H$ cu secvenţa L suferă un rearanjament, unindu-se cu ansamblul DJ, formând VDJ. Acesta este transcris într-un ARN premesager. Secvenţele ARN care corespund intronilor şi exonilor neutilizaţi sunt excizate, iar cele care codifică sunt unite formând un ARNm matur, tradus într-un lanţ polipeptidic, care după ce ajunge în reticulul endoplasmic îşi pierde peptida semnal (L) (după M.P. Lefranc şi G. Lefranc).

cele două jumătăţi de molecule se asamblează prin legături disulfidice între lanţurile H (fig. 164).

Prima modalitate este specifică clasei IgM şi unor subclase de IgG, iar cea de a doua modalitate, specifică clasei IgA şi altor subclase de IgG. Asamblarea moleculei se face în cisternele ergastoplasmice (reticulul endoplasmic) şi nu la nivelul ribozomilor, întotdeauna existând un uşor exces de lanţuri *L*. Dacă pentru sinteza unei molecule de imunoglobulină sunt necesare 2 minute, pentru secreţia ei este nevoie de cca. 20 de minute, în această perioadă de "lag" realizându-se parcurgerea distanţei de la ribozomi până la membrană, adiţia glucidelor, polimerizarea moleculei etc. După eliberarea lanţurilor de pe poliribozomi şi formarea moleculei, imunoglobulinele sunt transportate în lumenul reticulului endoplasmic şi de acolo în complexul Golgi, unde se prind de membrană prin intermediul *Fc*. Glicoziltransferazele controlează ataşarea glucidelor la moleculă, după care are loc un proces de exocitoză (o pinocitoză inversă), prin care veziculele îşi varsă conţinutul în spaţiul extracelular, conţinut care, fie că ajunge în mediul exterior, fie că rămâne ataşat la exteriorul membranei limfocitului sub formă de receptori. Între moleculele secretate şi cele care rămân ataşate la membrană sunt diferenţe de structură a lanţului *H*, generate de intervenţia a două tipuri diferite de ARNm. Tipul implicat în sinteza moleculelor ataşate este ceva mai lung, astfel că lanţul *H* are un număr mai mare de aminoacizi decât numărul de aminoacizi în lanţul *H* al moleculei, care este eliberat în mediu. De exemplu,

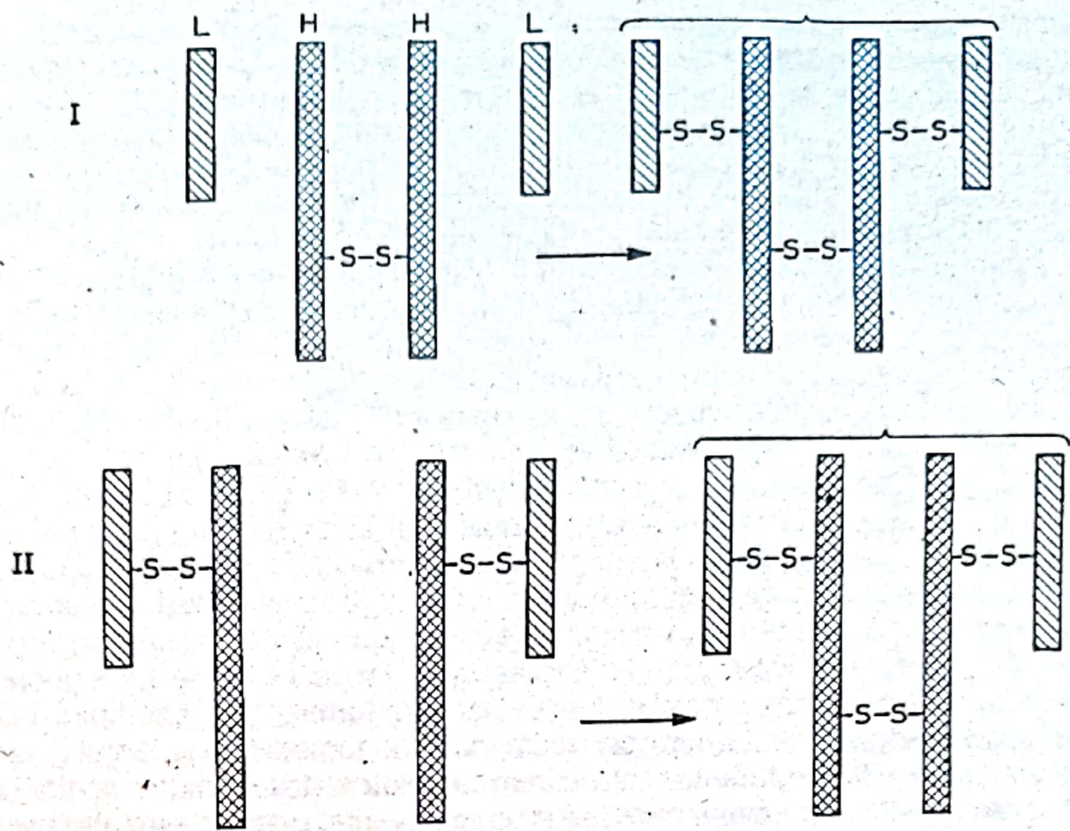



Fig.164. Două modalităţi diferite de asamblare a lanţurilor L şi H. În varianta I, se leagă iniţial lanţurile H, la care aderă ulterior lanţurile L.
În varianta II, se stabilesc legături -S-S- între un lanţ L şi unul H, după care se stabilesc legături H-H care unesc cele două jumătăţi de moleculă.

lanţul $\mu$ al moleculei de IgM secretată are o porţiune *C* terminală cu 20 de reziduuri de aminoacizi hidrofobi la care este ataşat un grup glucidic, pe când cel al moleculei ataşate are 41 de aminoacizi hidrofobi implantaţi ca o ancoră în dublul strat lipidic al membranei.

Aceste două regiuni sunt codificate de segmente diferite de ADN, denumite $\mu s$ în cazul imunoglobulinelor secretate şi $\mu m$ în cazul celor ancorate la membrana celulară (fig. 165). Segmentul $\mu m$ este alcătuit din doi exoni, $\mu m$ 1, care codifică pentru 39 de aminoacizi, şi $\mu m$ 2 pentru 2 aminoacizi, toţi cei 41 de aminoacizi formând dispozitivul de ancorare a lanţului $\mu$ în membrana plasmatică. De fapt, numai 28 de aminoacizi sunt implantaţi în celulă (3 în citoplasmă şi 25 transmembranar), restul de 13 fiind extracelulari.

Un limfocit *B* are ambii precursori mARN, $\mu s$ARN şi $\mu m$ARN, pentru imunoglobuline secretate şi de membrană.

**Adiţia componentelor glucidice** se face prin intermediul glicoziltransferazelor care controlează legarea covalentă a acestora la resturile de asparagină situate în diferite puncte ale lanţului *H*. Ordinea de adiţie ar fi următoarea: glucozamina

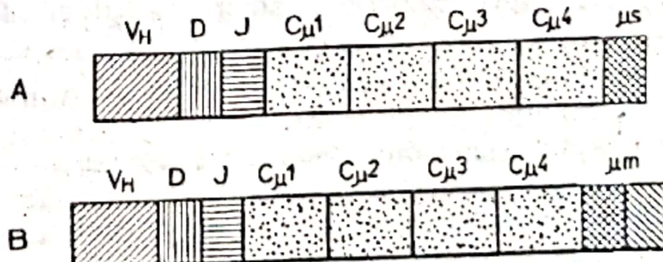



Fig.165. Segmentele ADN care codifică pentru lanţul $\mu$ al IgM secretat (A) şi pentru lanţul $\mu$ al IgM ancorat în membrana plasmatică (B).

(GlcN), manoza (Man), galactoza (Gal), glucoza (Glc) şi, la urmă, acidul sialic. Adiţia acestor hexoze se face în compartimente diferite ale celulei, GlcN, după unii, ataşându-se la lanţurile *H* aflate încă la nivelul ribozomilor (posibilitate neadmisă unanim), Man în cisternele ergastoplasmice, Glc la nivelul veziculelor Golgi, imediat după desprinderea lanţurilor de pe poliribozomi, iar fructoza şi acidul sialic, aproape de momentul secreţiei. De regulă, adiţia glucidelor la reziduul asparaginei se realizează prin legături N-glucozidice.

**Polimerizarea monomerilor** are loc în ultima fază, respectiv în timpul traversării membranei celulare, intracelular negăsindu-se polimeri, ci numai forma *7S*. Deci, expulzarea şi polimerizarea sunt evenimente simultane care implică prezenţa unor enzime şi a lanţului *J* a cărui sinteză are loc atât în celulele *B*-activate, cât şi în cele neactivate. În limfocitele activate, sinteza este mult mai activă, o celulă producând cca. $10^6$ lanţuri, pe când limfocitele *B* neactivate produc doar cca. $10^3$ lanţuri. Limfocitele *B* neactivate sintetizează acest lanţ indiferent dacă la nivelul lor are sau nu are loc polimerizarea imunoglobulinelor. Dacă nu are loc polimerizarea, lanţul produs este degradat intracelular, întregul proces fiind probabil o reminiscenţă filogenetică, o amintire a vremilor trecute, când celula sintetiza imunoglobulina care ajungea în circulaţie numai sub formă de polimeri. Indiferent de mărimea polimerilor, raportul dintre acesta şi lanţul *J* este de 1/1, concentraţia de lanţuri *J* controlând compoziţia polimerilor formaţi. De exemplu, în cazul moleculei de IgM există un raport optim între monomerii IgM şi lanţul *J*, nici una dintre cele două componente nefiind în exces. Polimerizarea monomerilor implică integrarea mai multor evenimente biochimice diferite, primul dintre ele fiind acela de formare a dimerilor prin ataşarea lanţului *J*. În cazul IgM, polimerizarea ulterioară este realizată prin interacţiuni necovalente între formele dimer şi subunităţile monomer, interacţiuni care se blochează în momentul formării pentamerului.

Dar cum se poate explica existenţa în afara celulei a unor molecule aparţinând aceleiaşi clase de imunoglobulină, care au diferite grade de polimerizare, cum este cazul celor de IgA? De ce în cazul IgA există molecule monomer, dimer, trimer, iar cele de IgM sunt numai sub formă de monomer sau pentamer?

Se pare că ar fi două fenomene care decid asupra gradului de polimerizare, şi anume: viteza de expulzie a moleculei din celulă şi modul de ataşare a lanţului *J*. Dacă sinteza şi eliminarea se fac rapid, respectiv dacă trecerea prin aparatul Golgi spre exterior este accelerată, molecula rămâne monomer. Dacă eliminarea este lentă, polimerizează. De asemenea, în cazul moleculelor de IgM, sinteza lanţului *J* este astfel balansată încât producerea acestuia nu este nici în minus nici în exces. În cazul moleculelor IgA, poate fi un deficit sau un exces de lanţ *J*, din care cauză se vor forma polimeri, o formă de "economisire" şi de folosire intensă a lanţului, sau "dimeri", o formă mai puţin "economică".

**Comutarea sintezei moleculelor de imunoglobuline.** Dacă un animal este stimulat antigenic, după prima inoculare în serul lui vor apărea anticorpi din clasa IgM cu specificitate pentru antigenul respectiv. După inoculări ulterioare, anticorpii, deşi vor recunoaşte acelaşi antigen, vor aparţine altor clase de imunoglobuline, ca de pildă claselor IgG, IgA etc. Procesul care asigură variaţia claselor de imunoglobulină cu menţinerea specificităţii lor funcţionale, respectiv asamblarea la acelaşi situs combinativ $V_H + V_L$ a diferite regiuni $C_H$, se numeşte "comutare".

Altfel spus, comutarea este procesul prin care se schimbă regiunea constantă a lanţului greu menţinându-se cea variabilă, adică specificitatea de anticorp. Comutarea claselor de imunoglobulină are loc în orice moment al proliferării limfocitelor *B*, dar în special în două momente ale acestei proliferări: a) în momentul

maturării limfocitelor *B* şi apariţiei celulelor imunocompetente şi "virgine", când are loc comutarea de la $IgM^-$, $IgD^-$ spre $IgM^+$, $IgD^+$ şi b) după activarea celulei de către stimulul antigenic, când are loc comutarea de la IgM la IgG, IgA sau IgE.

După generarea genei funcţionale $V_H D_H J_H$, prima genă pentru segmentul *C* adiţională este $C\mu$. În măduva osoasă şi ficatul fetal, celulele pre-*B* exprimă $C\mu$, dar nu şi lanţurile *L*. După asamblarea genelor $V_L J_L$ apar pe suprafaţa celulei molecule IgM cu funcţii de receptor pentru antigen, după care are loc exprimarea $C\mu$ şi $C\delta$ care leagă aceleaşi gene $V_H D_H J_H$ ca urmare a combinărilor terminaţiei diferenţiale şi a transcrierii $V_H D_H J_H + C\mu$ sau $C\delta$. În acest fel se realizează comutări IgM/IgD pe celule *B* naive aflate în $G_0$ care pot fi de acum stimulate şi care, după stimulare, proliferează şi se diferenţiază în plasmocite sau celule de memorie. La acestea vor avea loc, cu o mare frecvenţă, comutări în exprimarea genelor $C\gamma$, $C\varepsilon$ sau $C\alpha$.

Comutarea recunoaşte mecanisme genetice de deleţie sau transcriere, la acelaşi segment de gene *VDH*, a diferite gene *C*. În cursul răspunsului imun primar, la segmentul *VDH* care codifică pentru regiunea variabilă a moleculei, deci pentru specificitatea ei idiotipică, este transcrisă gena care va conferi caracterul de clasă IgM moleculei. În timpul maturării răspunsului, are loc activarea unor mecanisme mutaţionale care determină deleţia genei şi transcrierea la acelaşi segment *VDJ* a altor gene. Cu alte cuvinte, ansamblul rearanjat $V_H - D - J_H$ asociat prealabil la gena $C_H$ poate fi asociat ulterior oricărui segment *C*. Aceste recombinări sunt posibile datorită existenţei la toate genele $C_H$ (în afară de $C\delta$) a unor frecvenţe particulare care participă la mecanismele de comutare, din care cauză se numesc "secvenţele *S*" (de la switch = a comuta). Există recombinaze specifice care recunosc secvenţele *S* corespunzătoare claselor şi subclaselor de imunoglobulină (fig. 166). Comutarea clasei realizată graţie regiunii *S* antrenează deleţia genelor $C_H$ situate între complexul *VDJ* şi gena *C* activă, favorizând formarea "buclelor de deleţie" şi eliminarea ulterioară a lor. Astfel, precursorii stimulării antigenice pot fi molecule cu aceeaşi specificitate de anticorpi dar care aparţin la clase diferite.

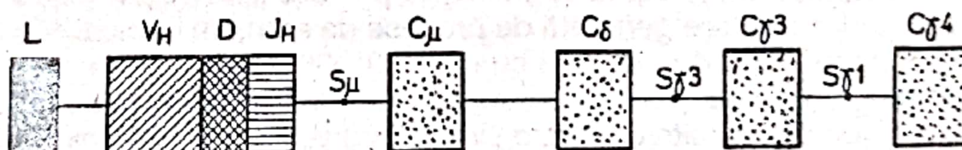



Fig.166. Secvenţele S (de comutare) la nivelul genelor C.

## CONTROLUL GENETIC AL RECEPTORILOR PENTRU ANTIGEN DE LA NIVELUL LIMFOCITELOR *T*

Receptorul pentru antigen al acestei clase de limfocite este un complex molecular format din lanţuri polipeptidice care participă la recunoaşterea antigenelor, la adeziunea celulelor, la transmiterea intracelulară a semnalelor etc. De aceea, controlul genetic al acestor receptori include toate genele care intervin în sinteza tuturor acestor lanţuri. De regulă, însă, sunt luate în considerare genele care codifică pentru lanţurile $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$, deoarece acestora le revine misiunea recunoaşterii specifice a epitopilor, fiind din acest punct de vedere similare lanţurilor *L* şi *H* ale moleculelor de imunoglobulină. De altfel, şi genele care codifică

pentru polipeptidele $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ au o mare omologie structurală cu genele imunoglobulinelor. Aceste polipeptide pot fi divizate în 7 regiuni: o regiune a leaderului hidrofobic formată din 17 - 22 reziduuri de aminoacizi, un segment variabil *V* cu 88 - 98 de aminoacizi, un segment de unire *J* aflat încă extracelular cu cca. 14 - 21 reziduuri, o secvenţă de 87 - 113 aminoacizi similară regiunii constante C a imunoglobulinei: o peptidă de unire cu lungimea variabilă, o regiune transmembranară de cca. 20 - 24 de aminoacizi şi o regiune citoplasmatică mică de 5 - 12 aminoacizi. Segmentele *V* şi *J* formează regiunea *V* lungă de cca. 110 aminoacizi şi similară regiunilor *V* ale imuno-globulinelor. Ca şi la imunoglobuline, sinteza lanţurilor $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ este controlată de către gene *V* pentru regiunile variabile şi gene *C* pentru cele constante, unite de gene *J* şi *D*. Vor fi deci $V\alpha$, $J\alpha$, $C\alpha$ etc.

Locii pentru genele $\alpha$ se găsesc atât la om cât şi la şoarece, pe cromozomul 14, pentru $\beta$ pe cromozomul 7 la om şi 6 la şoarece, iar pentru $\gamma$, pe cromozomul 7 la om şi 13 la şoarece. Pentru lanţurile $\gamma\delta\varepsilon$ din componenţa *CD*3, genele sunt pe braţul lung al cromozomului 11, iar pentru lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ ale *CD*8, pe cromozomul 2. Genele care codifică pentru celelalte segmente ale lanţurilor se găsesc pe aceiaşi cromozomi ca şi cele ale regiunilor *V*. În total sunt patru grupe de gene care codifică pentru receptorul pentru antigen al celulelor *T*: genele $\alpha$ şi $\beta$ exprimate pe majoritatea limfocitelor *T*, şi $\gamma$ şi $\delta$, exprimate pe o populaţie minoră din timus sau periferie. Domeniile *V* variabile şi *C* constante sunt codificate de exoni separaţi, un exon al domeniului *V* rearanjându-se într-o combinaţie particulară cu segmentele genelor *D* (diversitate) şi *J* (unire) în cazul genelor $\beta$ şi $\delta$, sau cu segmentul genelor *V* şi *J* în cazul celor $\alpha$ şi $\gamma$.

Lanţul $\alpha$ este codificat de către gene $\alpha$ care constă din cel puţin 100 de segmente $V\alpha$ separate, iar gena $C\alpha$ este unită de $V\alpha$ prin cel puţin 50 de segmente posibile de unire *J*. Familia $\alpha$, atât la om cât şi la şoarece, nu are segmentul de diversitate *D*.

Enorma diversitate a moleculelor receptorilor care trebuie să recunoască o largă varietate de antigene este generată de deleţia sau adiţia nucleotizilor de la joncţiunea *VJ*, numărul total la combinaţiile posibile fiind $100\ V \cdot 50\ J = 5\ 000$. Deci, este o diversificare generată de procese de aranjare genică.

Lanţul $\beta$ are cca. 14 subfamilii cu câte 20 - 30 de segmente de gene. Este asemănător familiei de gene $V_H$ a imunoglobulinelor, pe când $V\alpha$ a receptorului pentru antigen al limfocitelor *T* este similară cu $V_k$ imunoglobulinic. Diversitatea secvenţei aminoacizilor în lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ ale receptorilor pentru antigen pe limfocitul *T* este mai mare decât la familia de gene *V* a imunoglobulinelor. De altfel, segmentele *V* ale lanţurilor $\alpha$ şi $\beta$ pot fi total diferite din punct de vedere al secvenţei aminoacizilor în lanţ, chiar şi atunci când aparţin aceleiaşi familii. Mai mult, secvenţele controlate de genele de unire *J* sunt diferite ca număr: $J\alpha$ are 19 - 21 de codoni, iar $J\beta$ are doar 15 - 17 codoni.

Lanţul $\beta$ are şi gene *D*, la şoarece fiind identificate $D\beta1$ şi $D\beta2$. Şi regiunea constantă *C* are un $c\beta1$ şi $C\beta2$ fără deosebire funcţională între ele. Fiecare $C\beta$ are 8 exoni care codifică pentru: a) domeniul regiunii constante; b) aminoacizii care realizează dublele legături sulfidice interlanţ; c) domeniul transmembranar şi d) domeniul citoplasmatic.

Lanţul $\gamma$ are 14 gene V dintre care 6 sunt pseudogene, cinci gene *J* şi două *C* ($C\gamma1$ şi $C\gamma2$) dar, ca şi lanţul $\alpha$, este lipsit de genele de diversitate *D* (fig. 167). Lanţul $\delta$ are mai multe regiuni *V*, două *J*, două *D* şi una *C* cu 8 exoni. Este situat între segmentele $V\alpha$ şi $J\alpha$. Existenţa sau inexistenţa genelor de diversitate *D*, atât la lanţurile imunoglobulinice cât şi la cele polipeptidice ale receptorului pentru antigen de pe limfocitul *T*, stă la baza rearanjărilor fie *VJ*, fie *VDJ* (tabelul 95).

**Segmente în genele receptorului t pentru antigen la şoarece (după R. A. Hubbard şi J.J. Marchalonis)**

| Segmentul | Lanţul | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | $\delta$ |
| *V* | 100 | 50 | 9 | 3 |
| *D* | - | 2 | - | 2 |
| *J* | 50 | 6 | 2 | 2 |
| *C* | 1 | 2 | 2 | 1 |

Lanţul imunoglobulinic uşor *L* şi lanţurile $\alpha$ şi $\gamma$ ale receptorului pentru antigen *T* au rearanjări *VJ*, lanţurile grele *H*, $\beta$ şi $\delta$ au rearanjări *VDJ* care încep cu unirea *DJ* la care are loc adiţia *V* formându-se complexul *VDJ* şi, în final, adiţia C cu formarea complexului *VDJC*. Există asocieri "preferenţiale" predominante ca, de pildă, $V\gamma$ 2+$J\gamma L$+$C\gamma$1. Trei modalităţi principale generează diversitatea acestor proteine: a) diversitatea joncţională; b) unirea şi asocierea combinatorială şi c) mutaţii somatice.

Diversitatea joncţională începe cu variabilitatea în lungimea regiunilor *VDJ* încorporată în gena finală şi adiţia de secvenţe nemoştenite în linia germinativă.

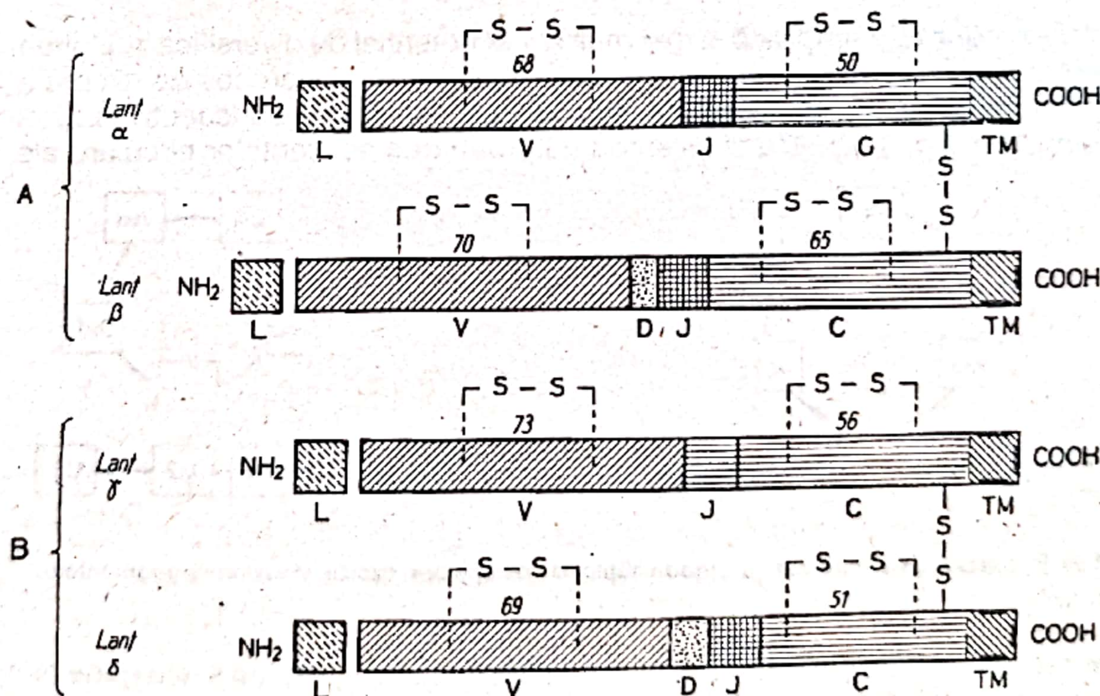



Fig.167. Reprezentarea schematică a segmentelor lanţurilor $\alpha\beta$ şi $\gamma\delta$ ale receptorului pentru antigen de pe celulele T, controlate de către gene diferite.

A=$\alpha\beta$; B=$\gamma\delta$; L=Leader; V,D,J,C=regiunile variabile, de diversitate, de unire sau constante ale lanţurilor; TM=segment membranar; C=reziduuri de cisteină care realizează dublele legături disulfidice -S-S-. Cifrele arată numărul reziduurilor de ar[illegible]oacizi (după S.M.H[illegible])

Unirea şi asociaţiile combinatoriale sunt un amestec aleatoriu între regiunile *V* şi *J* sau *VDJ*. De exemplu, 100 $V\alpha$ • 50 $J\alpha$ = 5 000 $V\alpha J\alpha$; 60 $V\beta$ • 2 $D\beta$ • 6 $J\beta$= 1 560 $VDJ\beta$; 6$V\delta$ • 2$D\delta$ • 2 $J\delta$ = 24 $VDJ\delta$. Deci lanţul $\alpha$ are cel mai mare potenţial de diversitate, deşi este lipsit de genele *D*.

Prin asociaţii combinatoriale $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$, diversitatea se amplifică enorm: 5 000$\alpha$ • 1560$\beta$ = cca. 8 • $10^6$ heterodimeri (la şoarece). Acest număr poate fi multiplicat prin diversitatea joncţională, fapt care face ca potenţial, diversitatea de recunoaştere să fie enormă. De exemplu, la receptorul $\gamma\delta$ numărul combinaţiilor este de cca. 500, dar enorma diversitate a regiunii de unire face ca repertoriul de recunoaştere să fie de cca. $10^{13}$, poate şi datorită faptului că gena $\delta$ este localizată în linia germinativă, în mijlocul locusului $\alpha$ (fig. 168). Rata mare de mutaţii somatice

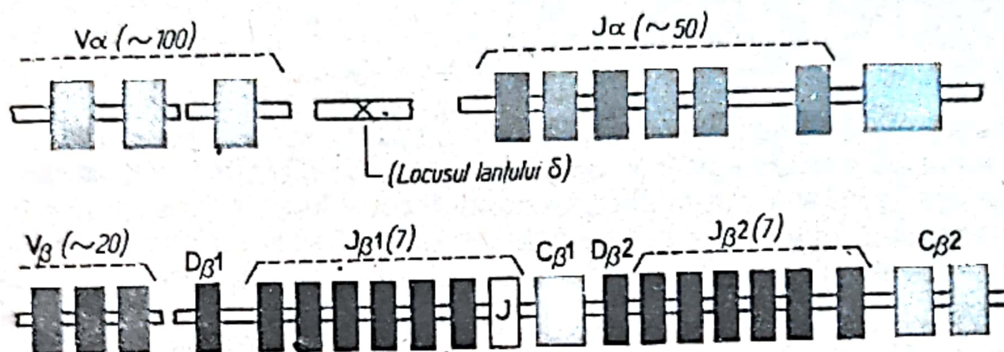



Fig.168. Genele receptorului $\alpha\beta$ murin. Lanţul $\delta$ are genele intercalate în şirul de gene $\alpha$. Fiecare set de gene J$\beta$ se termină cu o pseudogenă (după I. Roitt şi col.).

la nivelul exonilor *VDJ* amplifică şi mai mult acest potenţial de diversificare. Unirea segmentelor în cursul rearanjărilor are loc probabil printr-un proces de excizie a unor secvenţe şi de fuziune a extremităţilor secvenţelor liniare, consecutiv exciziei celor circulare (fig. 169). Studii referitoare la formarea secvenţelor circulare ale

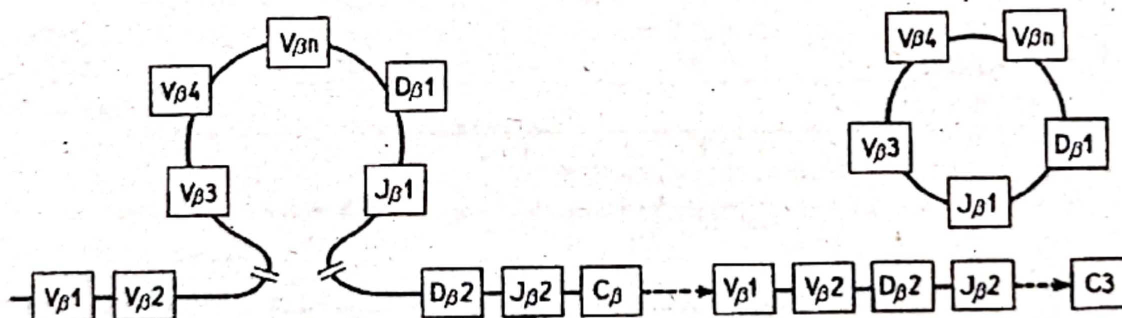



Fig.169. Reprezentarea schematică a modalităţilor de deleţie prin excizie şi fuziune a segmentelor lineare, cu formarea de segmente circulare de gene.

genelor $\alpha$ ale receptorului pentru antigen al limfocituluiT precum şi ale genelor $\delta$ au demonstrat existenţa următoarelor tipuri de rearanjări posibile la locusul $\alpha/\delta$ al receptorului:

- unire D$\delta$1 - D$\delta$2;
- rearanjări incomplete ale genei $\delta$ (V - D$\delta$) care sunt înlocuite de rearanjări *V$\delta$J$\delta$*;
- eliminarea rearanjărilor *V-D-D-J*, *D$\delta$-J$\delta$* sau *J$\delta$-J$\alpha$* nefuncţionale;
- rearanjările *V$\alpha$-J$\alpha$* pot fi înlocuite de alte rearanjări V$\alpha$J$\alpha$ mai eficiente.

Unirea capetelor segmentelor rezultate este uneori imprecisă, din care cauză au loc rearanjări nefuncţionale care însă generează mari variaţii. Imprecizia este generată de deleţii greşite ale segmentului sau de inserţia unor nucleotide cu alte particularităţi decât cele care urmau să fie asamblate.

Intratimic, genele care codifică pentru regiunile *V* sunt asamblate sub controlul unei serii de "gene de rearanjare". De exemplu, la receptorul pentru antigen cu heterodimerul $\alpha\beta$, genele $\beta$ sunt exprimate iniţial prin asamblarea membrilor segmentelor de genă $V\beta$, $D\beta$ şi $J\beta$, după care sunt asamblate segmentele genelor $V\alpha$ şi $J\alpha$. Regiunile *V* ale imunoglobulinelor, ale *CD4*/*CD8* şi ale lanţurilor $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ ale receptorului pentru antigen al limfocitului *T* sunt omoloage, dat fiind faptul că provin dintr-o genă ancestrală unică. Din această cauză, situsul combinativ al imunoglobulinei şi al receptorului *T* au aceeaşi specificitate de recunoaştere (bineînţeles, dacă aparţin clonelor "predestinate" să recunoască un epitop comun). Mai mult, repertoriul de recunoaştere acumulat în cursul ontogeniei limfocitului *T* se realizează prin mecanisme similare celor folosite de celula *B* în producerea imunoglobulinelor. Pe lângă generarea unui larg repertoriu de recunoaştere, prin unirea combinatorială a segmentelor de gene care există în copii multiple în genom, sunt utilizate şi alte mecanisme de diversificare a regiunii variabile: flexibilitatetea joncţională, unirea imprecisă a segmentelor de gene, adiţia în cursul procesului de rearanjări somatice la punctele de unire a unor nucleotide care nu există în genom etc.

# COOPERĂRI CELULARE ÎN RĂSPUNSUL IMUN

Un determinant antigenic care vine în contact cu sistemul imun declanşează un şir de reacţiii care vizează neutralizarea şi eliminarea lui din intimitatea ţesuturilor organismului agresat. Aceste reacţii implică fie proliferarea clonelor de limfocite care au receptori specifici pentru determinantul respectiv, fie sinteza de anticorpi care-l pot recunoaşte specific prin situsurile lor combinative. În primul caz, reacţiile imune sunt "mediate celular", adică prin intervenţia directă a celulelor efectoare, iar în cel de al doilea caz "mediate umoral", adică prin anticorpi.

Dar, pentru declanşarea acestor reacţii este necesar ca celulele limfoide să primească semnale activatoare de la antigenele străine de organism, semnale care să le antreneze spre proliferare şi/sau sinteză de citokine sau de imunoglobuline. Semnalul strict necesar pentru activarea proceselor metabolice ale celulei este furnizat de receptorul pentru antigen sau pentru lectine, după ce a recunoscut ligandul respectiv. El constituie "mesagerul primar" şi se instalează consecutiv fixării ligandului la receptor, proces în urma căruia receptorii de la nivelul membranei plasmatice se "aglomerează", facilitând transmiterea de noi mesaje în interiorul celulei. Această "aglomerare" este realizată fie de către antigenele timo-independente care, datorită monotoniei repetitive a epitopilor de la nivelul moleculei interesează simultan un număr mare de receptori "focalizând" semnalele şi amplificând potenţialul mesager, fie de căre antigenele timo-dependente care nu au unităţi repetitive. În cazul antigenelor timo-independente, stimulul nu solicită semnale auxiliare, pe când în cazul celor timo-dependente, care reprezintă cvasi-totalitatea antigenelor existente în natură, este necesară existenţa unor stimuli adiţionali. Şi într-un caz şi în celălalt, activarea celulei şi declanşarea răspunsului imun recunosc intervenţia a trei grupe de mesageri: a) mesageri primari, adică antigenele sau liganzii care se fixează la receptori; b) mesageri secundari, reprezentaţi de evenimentele care se instalează după recunoaşterea liganzilor de către receptori şi care sunt exprimaţi ca reacţiii biochimice la nivel membranar sau citpoplasmic, implicând activarea unui complex de enzime şi ioni, şi c) mesageri terţiari, respectiv factori de transcriere nucleară implicaţi în producţia şi activarea unor citokine sau a altor factori de genul NF-KB, NF-IL6 etc.

În mod cert, simpla legare a agentului stimulant la receptorul de la nivelul membranei plasmatice este inoperantă, o celulă fiind imposibil de antrenat de către antigen din faza de repaus $G_0$ spre fazele ulterioare de activare $G_1$, S şi $G_2$. Pentru aceasta este nevoie de intervenţia a cel puţin două semnale, unul principal sau semnalul I, lansat de către antigen sau lectine, şi altul "secundar", sau semnalul II, lansat de LPS, endotoxine, citokine sau de diverse contacte intercelulare. Ca atare, sunt necesare mai multe tipuri de celule care, fie prin mesageri

moleculari reglatori (activatori , inhibitori etc.), fie prin contact direct, coordonează evoluţia celulei activate până la stadiul final de celulă efectoare (plasmocit, limfocit citotoxic) sau de memorie.

Schematic, pentru declanşarea cascadelor reacţionale la nivelul limfocitelor, sunt implicate următoarele momente:

a) recunoaşterea antigenului străin, captarea, prelucrarea şi prezentarea lui într-o manieră accesibilă altor celule;

b) primirea informaţiei despre natura antigenului şi declanşarea cascadelor de reacţii biochimice intracitoplasmatice finalizate prin proliferare celulară şi activarea sintezei proteinelor;

c) neutralizarea antigenului şi activarea mecanismelor de control care vor readuce tot sistemul imun în stadiul iniţial de "acalmie", dar cu un număr sporit de molecule de anticorp sau de celule de memorie gata oricând, la un nou contact cu acelaşi agresor, să dezvolte mult mai prompt şi mult mai intens reacţiile de apărare imună.

Recunoaşterea, prelucrarea şi prezentarea antigenului este atributul funcţional al mai multor populaţii celulare denumite "celule antigen prezentatoare" sau APC (antigen-presenting cells) (tabelul 96). Acestea fie că-l internalizează prin fagocitoză sau pinocitoză şi-l scindează în peptide imunogene pe care le prezintă limfocitelor în asociere cu moleculele MHC proprii de clasa I sau II, fie că îl reţin ca atare la nivelul membranei facilitând contactul acestora cu limfocitele care au receptori specifici pentru el. Din prima categorie fac parte macrofagele, iar din a doua, limfocitele *B* şi celulele dendritice şi, întrucâtva, limfocitele *T*.

Indiferent cărei clase aparţin, celulele APC trebuie să întrunească următoarele condiţii: a) să exprime pe suprafaţa lor antigenele MHC de clasa II; b) să poată reţine şi eventual "prelucra" antigenul; c) să poată elibera unul sau mai multe semnale auxiliare către limfocitele *T*.

*Tabelul 96*

**Diferite populaţii de celule APC (după Roitt şi col.)**

| Linia celulară | Tipul de celulă | Localizare | Funcţii fagocitare |
|---|---|---|---|
| Mieloidă (monocitar-macrofagică) | Monocite | Sânge | + |
| | Macrofage | Ţesuturi | + |
| | Kupffer | Ficat | + |
| | Microglii | Creier | + |
| Celule APC nefagocitare | Langerhans | Piele | - |
| | Dendritice interdigitale | Ţesuturi limfoide | - |
| | Dendritice foliculare | Ţesuturi limfoide | - |
| Limfoidă | Limfocite *B* | Ţesuturi limfoide | - |
| Facultativ APC | Astrocite | Creier | + |
| | Celule endoteliale | Vase | - |
| | Fibroblaste | Ţesut conjunctiv | |

De regulă, antigenele corpusculare sunt fagocitate şi scindate, iar cele moleculare sunt pinocitate sau pur şi simplu reţinute pe suprafaţa membranei celulelor APC, care au ca rol fiziologic atât prezentarea antigenului asociat cu moleculele MHC cât şi generarea semnalului II.

Peptidele mici pot să nu fie recunoscute când sunt prezentate ca parte a unei molecule de proteină intactă. De aceea, ele trebuie să ajungă în interiorul celulelor fagocitate prin pinocitoză sau fagocitoză unde sunt degradate în peptide, care ulterior sunt asociate cu moleculele de clasa II MHC şi prezentate limfocitelor. Endocitoza, adică internalizarea, poate fi realizată prin fagocitoză neimună sau prin opsonizare. În cazul fagocitozei, corpusculii ingeraţi sunt degradaţi la nivelul fagolizozomilor, epitopii fiind exprimaţi în vederea informării celulelor *T*. Şi în cazul complexelor ligand-receptor sau ligand-anticorp, deci al endocitozei opsonice, are loc o deformare a membranei celulare, cu formarea unei depresiuni şi apoi a unei vezicule prin care este internalizat materialul fagocitat.

Sunt următoarele momente, atât la celulele fagocitare cât şi la cele nefagocitare, dar care-şi internalizează receptorii: a) legarea proteinelor la receptori; b) internalizarea complexului ligand-receptor; c) desfacerea complexelor şi degradarea ligandului; d) asocierea la moleculele MHC; e) exprimarea pe suprafaţa membranei celulare.

Membrana plasmatică a celulelor eukariote este căptuşită cu o peliculă de molecule denumită "clathrin" care are rol în endocitoza hormonilor, proteinelor, virusurilor, toxinelor etc. După fixarea liganzilor se formează la nivelul membranei un fel de "depresiuni tapisate" cu clathrin care se închid sub formă de "vezicule tapisate" în care sunt liganzii şi receptorii care i-au fixat (fig. 170).

"Veziculele tapisate" nu au capacitatea de discriminare, internalizând orice complex existent pe suprafaţa celulei, această capacitate revenind în exclusivitate receptorului. Soarta proteinei internalizate este diferită dar, de regulă, ea este eliberată către organite subcelulare specifice.

Complexele ajung în vezicule netapisate, cu *p*H acid, acidifierea fiind ATP-dependentă, unde sunt desfăcute în părţile lor componente, respectiv în receptori, care vor fi exprimaţi pe suprafaţa celulei, şi în liganzi care vor fi degradaţi ca urmare a fuziunii veziculelor cu lizozomii. Materialul astfel prelucrat este proiectat pe suprafaţa celulei în asociere cu moleculele MHC de clasa II. De fapt, în afară de fagocitoză şi degradare intracelulară, celulele APC pot reţine şi prezenta antigenul în diverse modalităţi: îl pot reţine la suprafaţa membranei legându-l la receptorii de natură imunoglobulinică, cum este cazul limfocitelor *B*, îl pot lega la receptorii pentru *Fc* sau pentru complement atunci când circulă sub formă de complexe antigen-anticorp, sau poate fi pur şi simplu reţinut pentru un timp îndelungat de către celulele dendritice foliculare sau interdigitale. Acestea îl asociază probabil cu moleculele MHC care circulă liber în plasmă.

Există diferenţe şi în privinţa prelucrării şi prezentării antigenelor de origine endogenă sau exogenă. Antigenele endogene, adică cele sintetizate endogen, ca de pildă proteinele virale produse în celulele infectate, se asociază ca fragmente de proteină la antigenele MHC de clasa I stimulând limfocitele *T CD* $8^+$ Peptidele acestora, imediat după sinteza lor în reticulul endoplasmic, leagă moleculele MHC formând un complex peptidă-MHC. Moleculele MHC de clasa I au un situs de legare a peptidelor pentru antigen care este în permanenţă ocupat de către peptidele proprii, cele exogene, străine de organism, fiind nevoite să competiţioneze cu cele endogene pentru a putea ocupa aceste situsuri. Când

peptidele proprii au fost dislocate de către cele străine, complexul antigen-moleculă MHC de clasa I este exprimat pe suprafaţa celulei şi expus recunoaşterii limfocitelor *Tc* ($CD8^+$).

Antigenele exogene (proteine solubile, proteine virale etc.) sunt endocitate şi degradate de către APC în endozom, după care interacţionează cu moleculele MHC de clasa II, complexul format fiind transportat spre suprafaţa celulei şi expus recunoaşterii limfocitelor *Th* ($CD4^+$). Acest complex asociază necovalent o moleculă de 31 kD lipsită de polimorfism, din care cauză este denumită "lanţul invariabil" (Li) care este prezent la toate tipurile de celule care exprimă MHC de clasa II. Acest lanţ, codificat de o genă unică , există sub forme cu dimensiuni diferite: 31 kD, 33 kD 41 kD şi 43 kD. El ar bloca "fosa" de legare a peptidei-antigen de la nivelul moleculelor MHC de clasa II până la endozom, unde se detaşează favorizând legarea peptidelor de origine exogenă şi mai puţin pe cele de origine endogenă. Aceste lanţuri sunt responsabile de transportul selectiv în cursul

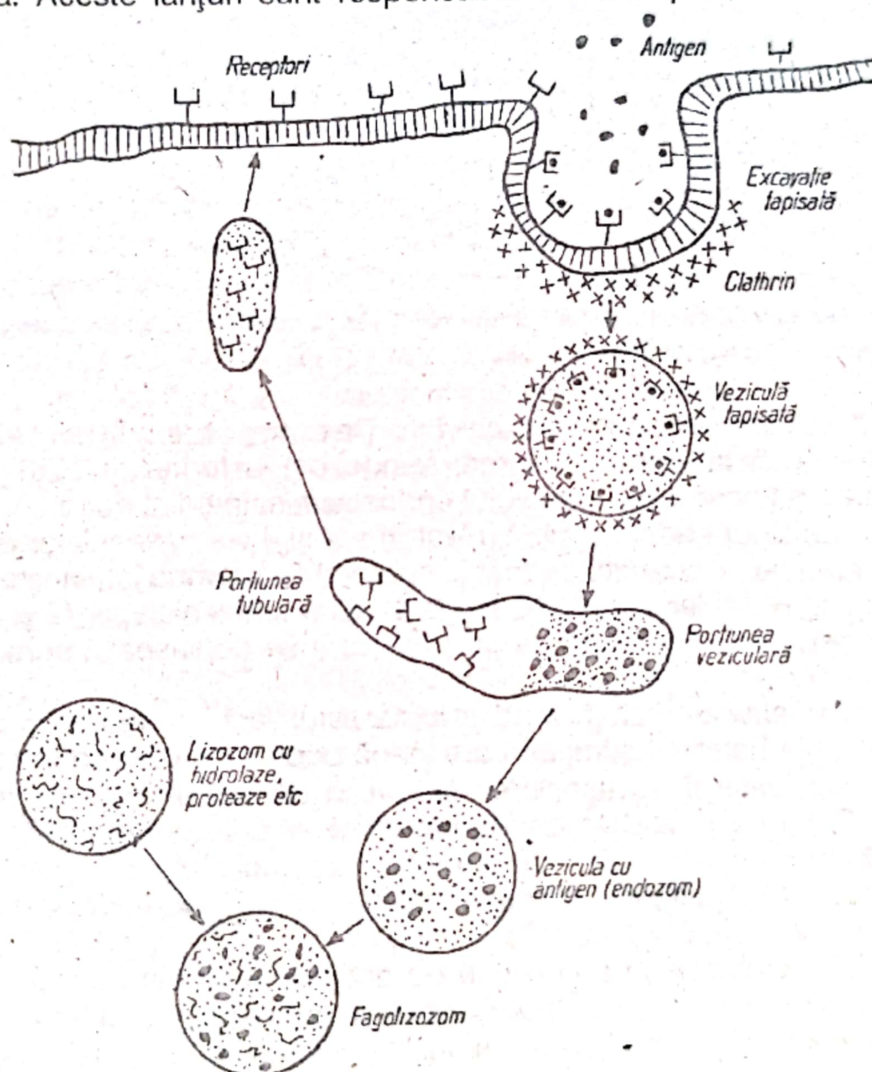



Fig.170.Prelucrarea antigenului în celula "prezentatoare de antigen" şi reexprimarea receptorilor pe membrană. Receptorii de pe membrana plasmatică recunosc şi leagă antigenul, formând o excavaţie căptuşită de "clathrin" care se închide, formând o veziculă "tapisată" şi apoi un endozom unde complexele antigen-anticorp sunt foarte numeroase. Endozomul se alungeşte sub formă de spirală, antigenul se desprinde de receptor polarizându-se la un pol iar receptorul la alt pol. Se formează două vezicule diferite, una cu receptorii liberi care vor emigra spre suprafaţă unde vor fi reexprimaţi, şi alta care va fuziona cu lizozomii în vederea degradării materialului fagocitat.

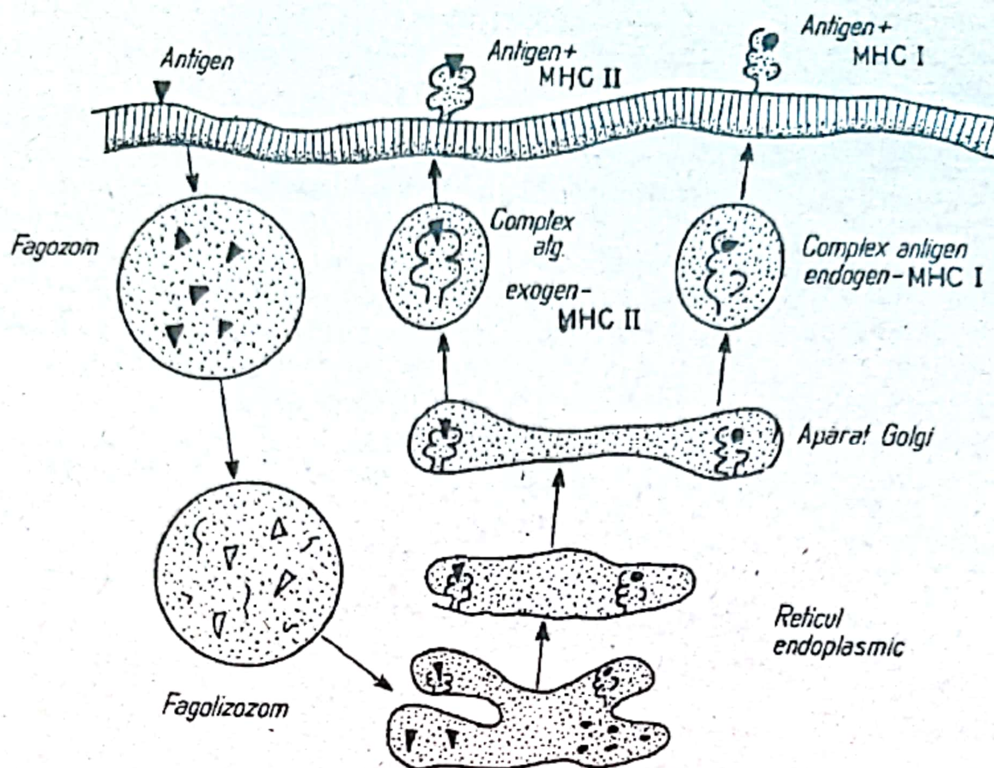



Fig.171. Model ipotetic de formare a complexelor peptidă-molecule MHC de clasa I şi clasa II (după G.J. Hämmerling şi J. Moreno).

traversării diferitelor compartimente celulare. De exemplu, lanţul de 31 kD dirijează moleculele MHC de la aparatul Golgi către endozom, iar forma de 33 kD generează un semnal de reţinere a lor în reticulul endoplasmic. Imediat după sinteză, *Li* se asociază în reticulul endoplasmic cu lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ ale moleculelor de clasa II, după care complexul este transportat în aparatul Golgi unde întâlneşte antigenul exogen (fig. 171). Moleculele MHC leagă peptida antigenică, iar *Li* se disociază în timp ce peptida şi molecula de MHC clasa II se deplasează spre suprafaţa celulei.

Există şi o altă ipoteză privind rolul acestui lanţ: ar bloca sau modifica depresiunea din heterodimerul $\alpha\beta$ care leagă peptida, protejând în felul acesta moleculele de clasa II de asocierea la nivelul reticulului endoplasmic sau al aparatului Golgi cu peptidele endogene, care ar putea competiţiona cu cele exogene. Pentru aceasta, după ce părăsesc aparatul Golgi ajung în endozomi, unde se asociază cu complexul antigen+MHC de clasa II facilitându-le exprimarea pe suprafaţa celulară..

La nivelul membranei, fragmentele de antigen legate la molecula de MHC formează un complex care va fi recunoscut de către receptorul limfocitului *T*. La majoritatea antigenelor, fragmentul stimulant, adică epitopul, este reprezentat de o peptidă scurtă, cu o secvenţă de 10 - 15 reziduuri de aminoacizi. Pentru ca antigenele să poată stimula limfocitele *T*, ele trebuie să fie "prelucrate" de către celulele APC. Pentru unele, este suficientă "despachetarea" moleculei care să permită accesul peptidei la MHC, pe când pentru altele este necesară clivarea enzimatică. Din acest punct de vedere sunt antigene de tip I, cum ar fi fibrinogenul, produsele *Listeriei monocytogenes* etc., care nu necesită prelucrare, de tip II (lizozim, mioglobină) care necesită desfacerea moleculei şi prelucrarea ei, şi de tip III (citocrom, ovalbumină, insulină) care necesită clivaj înainte de legare

(fig. 9). Deci nu întotdeauna este necesară clivarea antigenelor în peptide, uneori fiind suficientă doar "despachetarea" lor. Peptidele proprii organismului, care sunt legate la molecula MHC de clasa I, nu sunt modificate, fapt care permite ipoteza existenţei unei legări slabe, care poate fi uşor dislocată de peptidele nonproprii sau de cele proprii modificate. Peptidele susceptibile să se lege la o moleculă MHC diferă între ele în ce priveşte numărul de aminoacizi (8 - 10 reziduuri pentru cele care se leagă la antigenele MHC de clasa I şi 13 - 17 pentru cele care se leagă la MHC de clasa II). Dar, indiferent de mărimea lor, ele trebuie să întrunească unele condiţii, şi anume: a) să se poată asocia la peptidele din "fosa" complexului MHC; b) să fie "amfipatice", adică să aibă o faţă hidrofobă care să vină în contact cu MHC şi alta hidrofilă, accesibilă receptorului pentru antigen de pe limfocitul *T*.

Legarea peptidelor la moleculele MHC în vederea realizării "complexului de prezentare" se face aşadar la nivelul unui "situs de legare", o scobitură adâncă, lată de cca. 10 Å şi lungă de 25 Å, existentă la nivelul domeniilor $\alpha 1$ şi $\alpha 2$ ale clasei de molecule MHC I, sau $\alpha 1$ şi $\beta 1$ ale clasei MHC II unde intervine şi lanţul *Li* care scoate moleculele din endozomi şi le proiectează pe "fosa" de legare a peptidei antigen (fig. 172). Domeniile $\alpha 1$şi $\alpha 2$ formează un fel de platou, prin apropierea a 8 pliuri $\beta$ antiparalele. În acest fel, se realizează o "fosă", un fel de pungă de dimensiunile menţionate mai sus, la nivelul căreia se fixează peptide, care este susţinută de un "picior" alcătuit din domeniul $\alpha 3$ al lanţului $\alpha$ şi din $\beta 2$–microglobulină (fig. 173). În cazul moleculelor MHC de clasa I, la situsul format din domeniile amintite se leagă peptide ceva mai scurte. Moleculele MHC de clasa II leagă peptide mai lungi, care depăşesc la extremitatea COOH terminală dimensiunile "fosei", fiind "şlefuite" de către o "carboxipeptidază" (fig. 174).

Secvenţa aminoacizilor la nivelul acestei scobituri face ca polimorfismul MHC să acţioneze pe două fronturi: a) să modifice specificitatea peptidei antigenice şi b) să modifice potenţialul de legare a receptorului pentru antigen de pe limfocitul

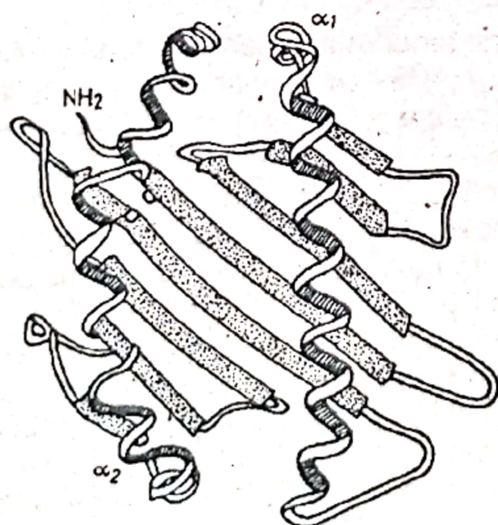


Fig.172. Situsul de legare a peptidei antigen la nivelul moleculei MHC este un "platou" alcătuit din 8 pliuri $\beta$ antiparalele mărginit de 5-helixuri ale domeniilor $\alpha 1$ şi $\alpha 2$ ale lanţului $\alpha$.

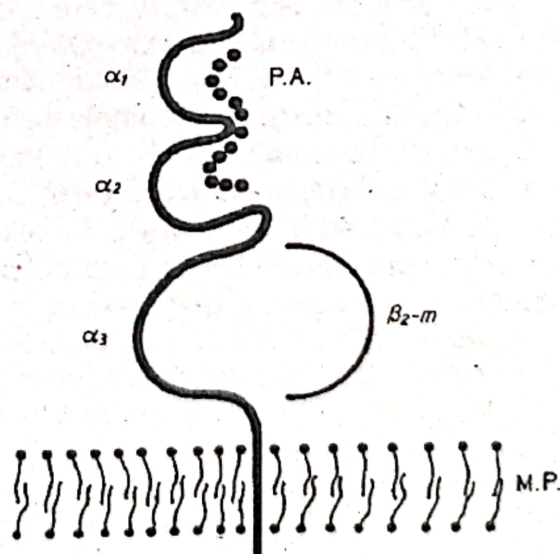


Fig.173. Reprezentarea schematică a legării peptidei antigen (PA) la situsul de legare. Domeniile $\alpha 1$ şi $\alpha 2$ formează "capul" care fixează antigenul, iar $\alpha 3$ şi $\beta$-2 microglobulina ($\beta 2$-m) "piciorul" structurii, implantat în membrana plasmatică (MP).

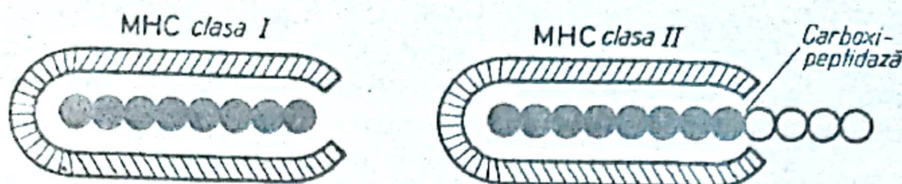



Fig.174. Diferenţe existente între peptidele-antigen prezentate în asociere cu moleculele MHC de clasa I şi clasa II. Peptida care ocupă situsul MHC de clasa II este mai lungă, fiind necesară "şlefuirea" ei la extremitatea COOH terminală de către o enzimă (carboxipeptidază).

*T*. La acest nivel se găsesc reziduuri acide, bazice sau non-polare care măresc şansa de ataşare a diferitelor polipeptide.

Asocierea cu $\beta$2- *m* este critică pentru exprimarea complexului MHC-antigen la suprafaţa celulei şi, deci, pentru stimularea limfocitelor *T*. Iniţial, peptida ar interacţiona într-o manieră reversibilă cu domeniile $\alpha$1 şi $\alpha$2 ale lanţului $\alpha$, cu asociaţii şi disociaţii competiţionale în cursul cărora se desprind peptidele slab legate şi se asociază cele cu aviditate mare. Se pare că legarea peptidei antigen la "fosa" $\alpha 1 \alpha 2$ nu este în totalitate un proces pasiv, deoarece necesită intervenţia ATP şi, deci, energie. De asemenea, fixarea, ca şi în cazul relaţiei antigen-anticorp, este influenţată nu numai de către reziduurile de aminoacizi din secvenţa peptidei legate, ci şi de către unii aminoacizi aflaţi la distanţă de locul de legare, fapt care demonstrează existenţa unei recunoaşteri specifice, condiţionată de structura complexă a moleculei de antigen şi nu numai de secvenţa grupării determinante.

Rezultă deci că antigenele străine de organism, pentru a deveni stimulante, trebuie să fie prelucrate sub formă de peptide mici şi prezentate de către celulele APC limfocitelor *T* numai în asociere cu moleculele MHC de clasa I sau II, adică "sub restricţie MHC". Cele de clasa I se asociază cu peptidele endogene, prelucrate în citosol, iar cele de clasa II, cu peptidele exogene, prelucrate în endozomi. Asocierea cu MHC, în afară de declanşarea reacţiilor imune, contribuie şi la selectarea limfocitelor *T* imature, care are loc în timus pentru cele cu receptori $\alpha\beta$ şi în periferie pentru cele cu receptori $\gamma\delta$.

Observaţia că limfocitele *T* recunosc antigenul în asociere cu proteinele de suprafaţă codificate de către complexul major de histocompatibilitate a înregistrat în ultimii ani o evoluţie considerabilă. Iniţial se credea că limfocitul *T* recunoaşte şi leagă molecula de antigen printr-o interacţie simplă, de genul celei antigen-anticorp. Demonstrarea ulterioară a faptului că această recunoaştere se face în asociere cu proteinele MHC a modificat conceptul, în sensul că s-a generat ideea existenţei unui receptor complex, cu funcţie multiplă, în virtutea căreia poate recunoaşte atât epitopul cât şi moleculele MHC ale celulelor APC. Acum este în afară de orice dubiu faptul că receptorul pentru antigen de pe limfocitul *T* leagă o peptidă mică, rezultată în urma prelucrării moleculei de antigen şi fixată într-o "scobitură" a proteinei MHC. Aşadar, celula *T* recunoaşte antigenul printr-un proces care diferă fundamental de reacţia antigen-anticorp.

Restricţia MHC a limfocitelor *Th* implică produsele genelor clasei a II-a a MHC (HLA-DP, DQ sau DR), pe când cea a limfocitelor *T* citotoxice, pe cele ale genelor clasei I (HLA-B, C, A). În acest scop, antigenul "brut" este clivat de către celulele APC şi redus la dimensiunea unor peptide mici imunogene, care vor forma un complex cu moleculele MHC, capabil să stimuleze fie limfocitele *Th*, fie pe cele *Tc*. După prelucrarea de către celulele APC şi reducerea la dimensiunea unei simple peptide, are loc asamblarea lanţurilor $\alpha$ şi $\beta$ sau a lanţului $\alpha$ cu $\beta_2$-microglobulina în vederea formării moleculelor de clasa II sau I a MHC şi asociere concomitentă

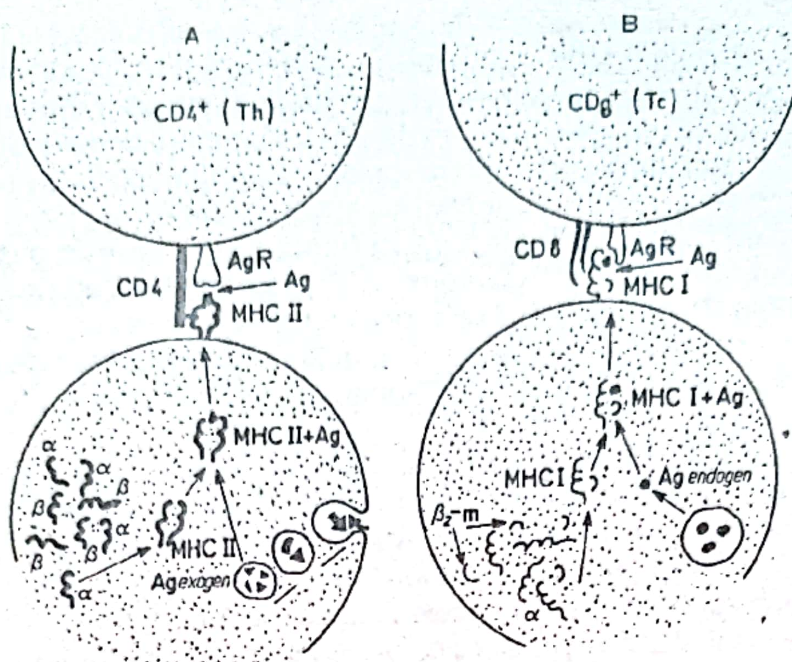



Fig.175. Prezentarea antigenului (Ag), în asociere cu moleculele MHC de clasa I sau clasa II, de către celulele APC.

A. Prezentarea complexului peptidă-antigen + molecule MHC de clasa II limfocitelor Th. Lanţurile $\alpha$ şi $\beta$ ale MHC de clasa II se asamblează în citoplasma celulelor APC, formând un "şanţ" (o fosă) în care se va fixa peptida stimulatoare (A). Aceasta va fi recunoscută de receptorul pentru antigen (AgR) iar MHC de clasa II de către CD4.

B. Lanţul $\alpha$ va lega în şanţul format de către extremitatea $NH_2$ terminală peptida antigen (•) care va fi re cunoscută de AgR de pe celulele Tc. MHC de clasa I va fi recunoscut de lanţul CD8 de pe limfocitul T.

la aceste molecule a peptidei imunogene în vederea stimulării limfocitelor *Th* sau *Tc* (fig. 175). După recunoaşterea antigenului de către celula *T*, este activat complexul *CD* 3 care va transduce semnalul activator în celulă; sunt implicate glicoproteinele *CD*4 sau *CD*8 care se vor lega la secvenţele constante ale moleculei de clasa II sau I ale MHC, glicoproteinele LFA-1 (CD11a) de pe membrana limfocitului *T* se leagă la ICAM-1 sau ICAM-2 de pe celula ţintă, CD2 de pe *T* se leagă la LFA-3 de pe ţintă, realizându-se în final activarea limfocitului *T*.

## LIMFOCITUL B, DREPT CELULĂ APC

Capacitatea limfocitelor *B* de a prezenta antigenul limfocitelor *T* a fost demonstrată prin sisteme experimentale multiple. Dacă celelalte celule - macrofagele şi celulele dendritice - nu au receptori specifici pentru antigen, limfocitele *B* au asemenea receptori. Ele pot lega antigenul prin receptorii de natură imunoglobulinică prezentându-l apoi foarte eficient limfocitelor *T*, dovedindu-se excelente APC. Se pare că la prezentarea antigenului de către limfocitele *B* este necesară selectarea celulelor cu receptori specifici, deoarece s-a constatat că un epitop este eficient prezentat limfocitelor *T* de către clona care are receptori pentru el şi mult mai slab de către alte clone, cu receptori de alte specificităţi. De asemenea, în cooperarea *T-B* este o participare "preferenţială", o clonă *B* "colaborând" preferenţial cu o anumită clonă de limfocite *T*, probabil

ambele cu receptori pentru acelaşi determinant antigenic. Nu este bine preciza dacă limfocitele *B* numai reţin antigenul la suprafaţă prin imunoglobulinele de membrană (mIg), sau îl şi prelucrează într-o manieră similară macrofagelor. Unii susţin că este o simplă reţinere, dar sunt dovezi experimentale care demonstrează contrariul. Astfel, dacă limfocitele *B* sunt puse în contact cu toxoidul tetanic şi cu limfocitele *T*h, acestea din urmă vor fi stimulate şi vor prolifera clonal la un anumit grad de intensitate. Dacă, însă, ele sunt incubate cu toxoidul timp de 1 - 2 ore şi după aceea sunt amestecate cu limfocitele *T*, răspunsul acestora este mult mai intens. Limfocitele *T* singure nu pot recepţiona semnalele de la peptide mici, deoarece acestea trebuie să fie asociate cu molecule MHC, de unde concluzia că limfocitele *B* au prelucrat toxoidul, l-au asociat cu MHC de clasa II şi l-au prezentat celulelor *T*h (fig. 176).

Incubarea celulelor *B*, în prezenţa antigenului şi clorochinei care provoacă creşterea *p*H-ului în endosomi inhibând astfel captarea şi prelucrarea, sau în prezenţa antigenului şi a azidei de sodiu sau deoxiglucozei (inhibitori ai metabolismului celular), aboleşte capacitatea stimulantă pentru celulele *T* a limfocitelor *B* preincubate. Deci, celulele *B* folosesc mIg numai pentru a capta şi concentra antigenul, dar nu-l prezintă ca atare celor *T*, ci numai după prelucrarea lui intracelulară şi apoi proiectarea la suprafaţa celulei. Nu se cunoaşte exact cum se face această prelucrare dar, în orice caz, proteinele mari nu sunt accesibile acestui tip de interacţie, candidaţi fiind numai peptidele mici, mărimea moleculei de antigen având importanţă crucială în procesul de recunoaştere de către limfocitele *T*.

Şi în cazul acestor celule APC, prezentarea antigenului se face sub restricţie MHC. Ca dovadă, limfocitele *B* prezintă toxoidul tetanic celulelor *T* autologe, dar nu şi celor alogene, iar anticorpii anti-molecule MHC de clasa II inhibă cooperar *B-T*. Această cooperare se realizează în condiţiile unei concentraţii de antig

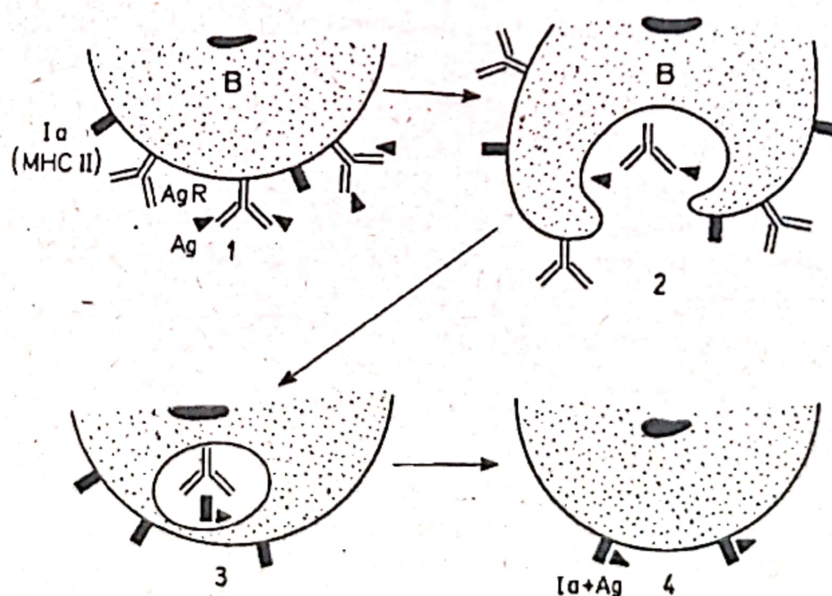



Fig.176. Funcţia limfocitului B ca celulă prezentatoare de antigen.

1. Limfocitul B fixează antigenul (Ag) la receptorul pentru antigen (AgR) de natură imunoglobulinică.
2. Complexul format este endocitat (printr-un proces de capping ?).
3. Intracitoplasmatic are loc disocierea antigenului de receptori şi probabil asocierea la moleculele MHC de clasa II.
4. Antigenul asociat cu MHC de clasa II (Ia+Ag) este exprimat pe membrana plasmatică, fiind recunoscut de către limfocitele T.

extrem de scăzute, fiind necesară cointeresarea unui număr foarte mic de receptori mIg. Acest fapt demonstrează că, în cazul prezentării antigenului de către limfocitele *B*, nu este necesară aglomerarea receptorilor pentru antigen.

Ar fi deci următoarele momente în exercitatea funcţiilor APC de către celulele *B*: a) recunoaşterea şi reţinerea antigenului de către limfocitele *B* prin receptorii mIg, care se poate realiza specific şi nespecific; b) prelucrarea lui; c) asocierea cu moleculele MHC de clasa II; d) prezentarea complexului antigen-molecule clasa II, limfocitului *T*h ($CD4^{+}$).

Limfocitele *B* sunt extrem de eficiente ca celule APC, putând prezenta antigenul limfocitelor *T* chiar şi atunci când acesta se găseşte în concentraţii foarte scăzute (de 1 000 ori mai mici decât concentraţiile necesare pentru alte celule APC). Cu toate acestea, ele nu sunt capabile să asigure toate semnalele necesare pentru activarea populaţiei *T;* acestea au nevoie de IL-1 sau de celule care produc IL-1 pentru a se angaja în ciclul de dezvoltare celulară.

## PREZENTAREA ANTIGENULUI DE CĂTRE CELULELE DENDRITICE

Prezentarea antigenului de către celulele dendritice se realizează prin modalităţi diferite: în absenţa sau în prezenţa moleculelor MHC de clasa I sau II. Sunt celule APC foarte "potente", care exprimă intens moleculele B7/BBI şi MHC de clasa II. Pentru activarea limfocitelor *T*, sunt necesare cca. 100 - 200 de complex peptidă + antigene MHC de clasa II. Antigenele exogene sunt prezentate eficie de către celulele dendritice numai atunci când sunt în cantitate mare.

Celulele dendritice foliculare, din foliculii secundari, sunt lipsite de molecule MHC de clasa II, aşa că ele pot prezenta celulelor $CD4^{+}$ antigenul reţinut pe suprafaţa lor, fără restricţie MHC. În medulara timusului însă, sunt celulele dendritice interdigitale bogate în antigene proprii, inclusiv cele MHC, pe care l prezintă limfocitelor *T* imature "învăţându-le" să facă distincţia dintre propriu şi non-propriu. Studii mai recente, care au folosit tulpini mutante de şoareci care se deosebeau între ele prin poziţia a trei reziduuri de aminoacizi la nivelul domeniilc $\alpha 1$ şi $\alpha 2$ ale moleculelor de clasa I sau clasa II a H-2, au demonstrat capacitatea celulelor dendritice de prezentare a antigenului sub restricţie MHC. Este posibil ca aceste celule APC, situate în poziţii strategice la nivelul organelor limfoide, să reţină pe suprafaţa lor atât antigenul, cât şi moleculele MHC libere, să le asocieze şi apoi să le prezinte limfocitelor. Activarea limfocitelor *T*, în special a celor $CD4^{+}$, necesită ocuparea heterodimerului $\alpha\beta$ al receptorului pentru antigen al limfocitelor *T* de către peptidele prelucrate şi exprimate pe suprafaţa APC împreună cu moleculele MHC de clasa II. Dar, diferitele celule APC se deosebesc între ele prin potenţialul şi modalitatea lor de stimulare *T*. Unele, mai puţin eficace în conexiunea moleculelor lor de clasa II cu $CD4^{+}$ sau în eliberarea de semnale costimulatoare, sunt mai ineficiente. Activarea costimulatoare este realizată de către macrofage, celule dendritice, celulele *B* activate, dar nu este realizată deloc sau foarte slab de către limfocitele *B* în stare de repaus sau de către limfocitele *T*. Ar fi secvenţe diferite de activare a limfocitelor *T*h. Celulele dendritice ar prezenta acestora epitopul dominant. Limfocitele *T* astfel "angajate" ar activa limfocitele *B* care, prin receptorii pentru antigen de natură imunoglobulinică, vor recunoaşte specific

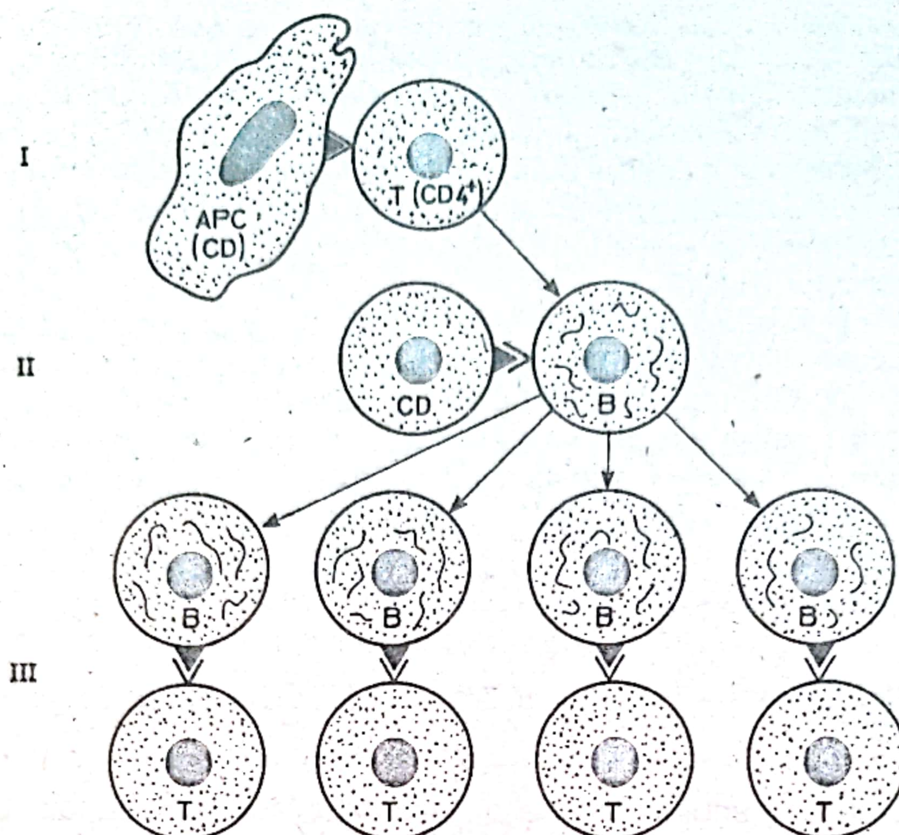



Fig.177. Mod de cooperare între limfocitele T, B şi celulele APC (dendritice = CD). CD prezintă antigenul limfocitelor CD4 care, odată angajat, cooperează specific cu limfocitele B. Limfocitele B activate internalizează epitopii, realizând diversificarea limfocitelor T naive care, la rândul lor, vor activa diversificarea celulelor B (după M.J. Mamula şi Ch.A. Janeway).

antigenul, devenind la rândul lor excelente celule prezentatoare de antigen ce vor stimula eficient alte limfocite $CD4^+$ "naive" (fig. 177).

Aşadar, în cooperările celulare care se instalează, consecutiv stimulului antigenic, participă diferite celule APC care recunosc, prelucrează şi prezintă antigenul limfocitelor *Th* sau *Tc* în maniere diferite. Macrofagele-monocitele, limfocitele *B* şi celulele dendritice sunt populaţiile majore de celule antigen-prezentatoare. Se pare însă că şi limfocitele *T* au un rol minor în astfel de funcţii. De regulă, ele nu sunt APC deoarece sunt incapabile să capteze antigenul în manieră nespecifică, dar ar fi capabile să-l prelucreze pe cel legat specific la receptori şi în special la *gp* 120 a HIV (virusul imunodeficienţei umane) pe care limfocitele $CD4^+$ îl prezintă celor $CD8^+$ ca semnal de activare a funcţiilor citotoxice pentru celulele infectate. Cooperările celulare educă sau stimulează limfocitele *T* în vederea angajării lor ca celule efectoare sau de memorie. În timpul educării, clonele autoreactive sau cu deficite funcţionale sunt eliminate sau supresate.

## COOPERĂRI CELULA APC - LIMFOCITE B

Se crede că foliculii limfoizi şi centrii lor germinativi, din organele limfoide secundare şi în special din splină, ar fi locul manipulării antigenelor unde s-ar face informarea limfocitelor *B* de memorie şi activarea lor pentru a deveni celule efectoare. Informaţiile despre antigen ar fi furnizate de către celulele dendritice foliculare care ar reţine complexele antingen-anticorp prin receptorii pentru *Fc*

sau complement şi le-ar prezenta apoi celulelor *B* de memorie. Celulele dendritice sunt cele mai "profesionale" APC din ţesuturile limfonodulare. Ele sunt influenţate în funcţiile lor de către diferite limfokine, de metaboliţi ai vitaminei *D* şi cooperează nu numai cu limfocitele dar şi cu macrofagele care ar prelucra o parte din antigenul prezentat de către celulele dendritice.

După stimulare, limfocitele *B* ar coloniza zonele marginale splenice şi centrii germinativi foliculari unde s-ar dezvolta în celule formatoare de anticorpi şi celule de memorie. Celulele *B* care nu interacţionează cu cele dendritice mor prin "apoptosis", fiind eliminate de către celulele fagocitare.

## COOPERĂRI ÎNTRE LIMFOCITELE T ŞI B

Descoperirea existenţei celor două clase majore de limfocite - *T* şi *B* - a marcat debutul perioadei moderne a imunologiei. În anul 1960, R. GOOD constată că şoarecii cu timoame sunt hipogamma- globulinici şi nu pot reacţiona la stimulii antigenici. În acelaşi timp, J.F.A.P. MILLER demonstrează experimental că absenţa timusului antrenează grave dezordini imune.

Se credea că timusul este unicul organ central al sistemului imun până în 1966 când H.M.CLAMAN, prin iradieri şi reconstituiri, demonstrează că de fapt sunt două populaţii celulare majore, cunoscute ulterior sub denumirea de *T* şi *B*, care cooperează între ele. Printr-o experienţă ingenioasă, s-a dovedit că limfocitele *T* au rol ajutător iar cele *B* secretă imunoglobulinele. Experienţa a constat din iradierea şoarecilor *CBA* şi reconstituirea lor cu celule timice, deci cu *T* recoltate de la alţi şoareci *CBA* şi cu măduvă osoasă *(B)* de la o subtulpină de *CBA* cu o anomalie cromozomială, denumită *CBAT 6T* 6. Limfocitele care secretau anticorpi aveau această anomalie, deci erau celule *B*. Dacă şoarecii iradiaţi erau reconstituiţi cu celule timice de la *CBAT 6T* 6 şi medulare de la *CBA* normali, celulele secretoare de anticorpi nu mai erau *T* 6 *T* 6, demonstrându-se fără echivoc că celulele *B* produc anticorpi dar că, pentru această funcţie a lor, au nevoie de ajutorul celulelor *T*.

Acum se ştie că această colaborare dintre limfocitele *T* şi *B* este necesară atât pentru activarea funcţională a ambelor clase de celule, cât şi pentru controlul răspunsului imun. Până nu de mult, se cunoştea numai necesitatea ajutorului obilgatoriu al limfocitelor *T* h pentru stimularea funcţională a celulelor *B* şi activarea sintezei anticorpilor.

La acest nivel al cunoştinţelor, relaţia *T* h-*B* este limitată la două momente:

a) Antigenul transmite limfocitelor *B* primul semnal ca urmare a legării încrucişate a imunoglobulinelor de membrană (mIg), în urma căruia se induc semnale activatoare intracelulare, sinteza ARN şi comutarea celulelor din ciclul $G_0$ la $G_1$. În acest stadiu, celulele exprimă receptori pentru limfokinele eliberate de către limfocitele *T* h;

b) Intervin limfocitele *T* h care eliberează semnalul II şi completează ciclul celular de la faza $G_1$ la faza *S* şi apoi $G_2$, acţionând prin două mecanisme distincte, şi anume, prin interacţiuni "înrudite" sub restricţie MHC clasa II sau prin factori solubili, fără restricţie MHC, ca urmare a intervenţiei IL-2, IL-4, IL-5, IFNγ etc. (tabelul 97).

Tabelul 97

**Diferite stadii de activare a limfocitelor B**

| Stadiile ciclului celular | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| $G_0$ | $G^{+}_{0}$ | $G_1$ ($G_1A$ / $G_1B$) | $S$ | $M$ | $G_2$ |
| | Exprimarea antigenelor MHC clasa II | Cresc volumul celulei şi sinteza ARN | Sinteza ADN | Diviziunea celulei | |

În $G^{+}_{0}$ se activează exprimarea antigenelor MHC de clasa II.

În faza $G_1$ timpurie ($G_1A$), începe să crească volumul celulei iar în $G_1$ târziu ($G_1B$) celula este angajată spre fazele ulterioare, de sinteză a ADN *(S)*, diviziune *(M)* şi apoi de repaus ($G_2$ şi $G_0$).

Exprimarea celor două mecanisme este condiţionată de starea de activare a limfocitelor *B* şi *T*. Pentru activarea limfocitelor *B* aflate în repaus ($G_0$) este necesar contactul direct cu *T* h antigen - specifice şi sub restricţie MHC. Creşterea şi diferenţierea celulelor *B* activate nu ar necesita contact direct sub restricţie MHC, ci doar intervenţia unor citokine. Dar, se pare că şi celulele *B* aflate în repaus pot fi totuşi activate în absenţa unei "punţi" *T* h-*B*, limfocitele $CD4^{+}$ putând transmite semnale către *B* fără restricţie genetică şi specificitate pentru antigen. O proteină de 33 - 39 kD din membrana limfocitelor *T* activate, chiar atunci când este desprinsă de membrana celulară, se leagă la moleculele *CD*40 de pe membrana plasmatică a limfocitelor *B*, declanşând creşterea şi diferenţierea acestora. Aşadar, în cazul restricţiei MHC ar fi necesar contactul direct, fizic, între *T* h şi *B*, contact suficient pentru a activa angajarea celulelor *B* în ciclul celular. De exemplu, limfocitele *T* h nu mai pot activa celulele *B* dacă sunt despărţite printr-o membrană semipermeabilă, fapt care demonstrează că limfocitele *B* au nevoie de contactul nemijlocit, sub restricţie MHC cu *T* h activate. Dar recent s-a dovedit că celula *B* poate prelucra antigenul molecular, necorpusculat, acţionând ca celulă APC: iniţial îl leagă la membrană, îl endocitează şi prelucrează în citoplasmă şi apoi îl prezintă limfocitelor *T*. La nivelul membranei plasmatice, limfocitele *B* ar avea un ligand - *B*7- pentru receptorul *CD*28 de pe suprafaţa limfocitelor *T*, receptor care de fapt este o glicoproteină homodimeră de 44 kD care ar funcţiona ca factor de creştere şi ar constitui un sistem heterofil de recunoaştere celulară implicat în prezentarea antigenului de către celula *B*, în cooperarea *T-B* şi în amplificarea semnalelor intracelulare la nivelul limfocitului *T*. *In vivo*, *CD*28 ar funcţiona atât ca moleculă de adeziune pentru stabilirea contactelor *T-B* cât şi drept component de suprafaţă pentru o cale de transducţie a unui nou semnal.

În aceste condiţii, receptorul pentru antigen de pe celula *B* prezintă antigenul celulei *T* h activând-o, activare care va antrena alte limfocite *B* astfel că, în realitate, activarea populaţiei *T* h de către celulele *B* prezentatoare de antigen este de fapt o relaţie cu dublu sens, semnalele activatoare mergând de la *B* către *T* şi de la *T* în spre *B* (fig. 178). Nu există diferenţe funcţionale semnificative condiţionate de maniera interacţiilor celulare, adică de instalarea de contacte fizice directe între celule, sub restricţie MHC sau în afara contactelor directe, prin mediatori solubili, fără restricţie MHC.

Interacţiunea dintre celulele *T* şi APC *(B)* are urmări pentru ambele tipuri de celule: *B* stimulează *T* care, odată activate, vor produce limfokine (IL-2, IL-4, IL-5,

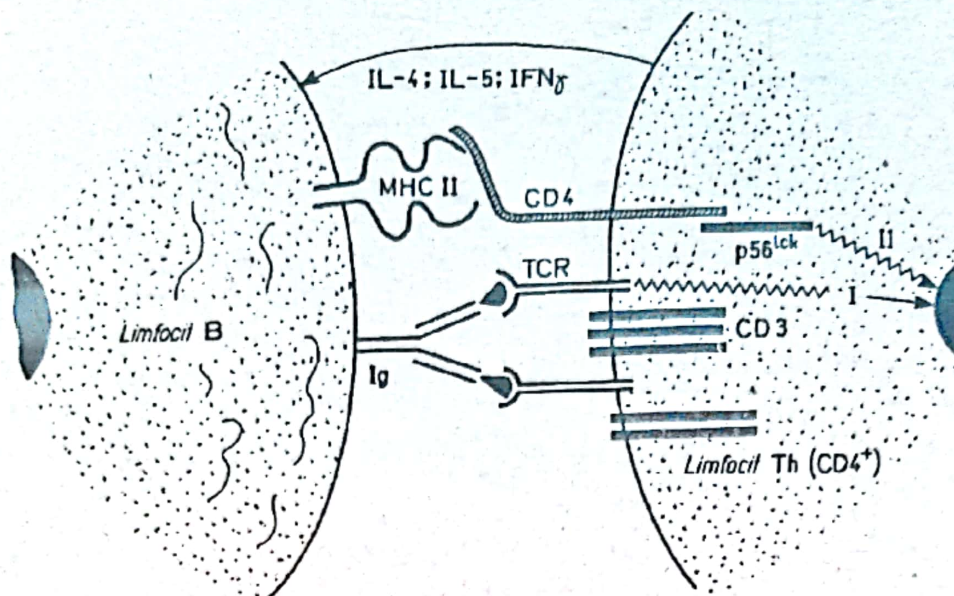



Fig.178. Stimularea reciprocă a limfocitelor CD4 (Th) şi B. Limfocitele Th primesc semnalul I de la antigenul prezentat de către limfocitele B prezentatoare de antigen. Stimulate, vor secreta limfokine care vor activa celulele B.

MIF, MAF, IFN-$\gamma$ etc.) cu efect stimulant pentru *B*. Unele date indică existenţa unor interacţiuni între două subpopulaţii de limfocite *T* distincte fenotipic, în vederea proliferării lor consecutiv stimulării cu anticorpi anti-*CD*3 în prezenţă de IL-2 exogenă: una dintre subpopulaţii este *CD*3$^+$HLA-Dr$^-$ iar alta, *CD*3$^+$HLA-DR$^+$. Prima nu răspunde la anticorpi anti-*CD*3 şi IL-2 decât în prezenţa celei de-a doua subpopulaţii, adică a celei DR$^+$. Dacă celulele *CD*3$^+$HLA-DR$^+$ sunt iradiate, populaţia DR$^-$ nu poate răspunde la stimulul cu anticorpi anti-*CD*3. Deci, este necesară cooperarea *T-T* între subpopulaţiile DR$^+$ şi DR$^-$ care să antreneze mobilizarea DR$^-$ spre proliferare celulară, în condiţiile existenţei IL-2 şi macrofagelor, de unde concluzia că ambele subpopulaţii au receptori pentru IL-1 şi IL-2.

Există cooperări între limfocite aparţinând claselor *T* sau *B*, adică cooperări *T-T* şi cooperări *B-B*. De asemenea, limfocitele *T* h sau *T* s controlează funcţiile *T*c, iar cele *B* activate pot mări de câteva ori răspunsul proliferativ policlonal şi sinteza de aticorpi a limfocitelor *B* stimulate cu anticorpi anti-$\mu$ sau cu limfokine. Activarea limfocitelor *T* este consecinţa interacţiunilor ligand-receptor, interacţiuni posibile datorită celulelor APC. Semnalul transmembranar iniţiază semnale secundare care funcţionează ca relee chimice şi antrenează limfocitul din poziţia $G_0$ spre celelalte timpurii, realizate consecutiv transducţiei semnalelor de la receptor urmate de cele târzii (proliferative) ca rezultat al cascadei de evenimente intracelulare. În timpul procesului de activare *T*, sunt reacţii prompte, instalate în decurs de secunde sau minute după stimul, şi reacţii târzii, de ordinul orelor sau zilelor (fig. 179).

Activarea poate fi exprimată prin antrenarea funcţională a unor gene latente, ca de pildă *c-fos* şi *c-myc,* sinteza de noi molecule şi în special secreţia de limfokine, exprimarea de receptori de membrană cum ar fi IL-2R, a receptorilor pentru transferină, proliferarea celulară şi, în final, exprimarea funcţiilor efectoare ale celulei ca de pildă funcţiile citotoxice. Sinteza limfokinelor sau monokinelor permite realizarea de cooperări celulare fără restricţie MHC, care pot coexista cu cele care se instalează sub restricţie MHC.

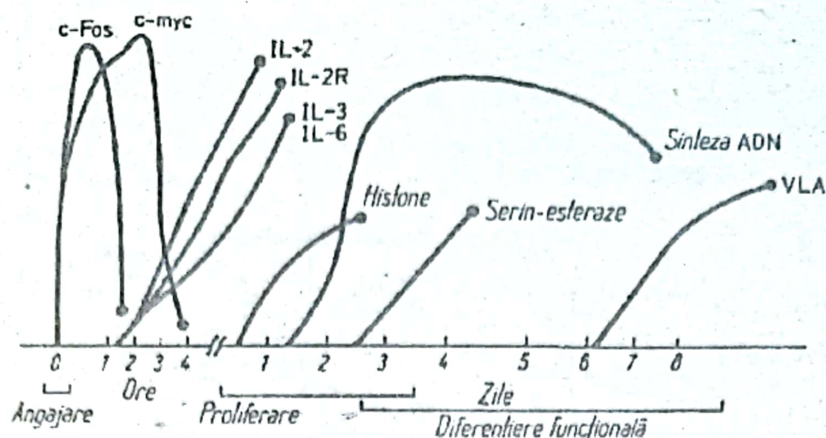



Fig.179. Secvenţe ale unor evenimente care au loc intracelular,ca urmare a activării limfocitului T de către antigen. (după K.S. Ullman şi col.).

## COOPERĂRI ÎNTRE DIFERITE POPULAŢII DE CELULE APC

Cooperările intercelulare sunt procese biologice complexe, prin care celulele transmit şi primesc semnale informative, operaţii care au loc simultan sau la intervale de timp foarte scurte. În aceste procese, sunt interesate şi diferite populaţii de APC care colaborează între ele pentru o mai eficientă prelucrare şi prezentare a antigenului. Un exemplu semnificativ este cel care se instalează *in vivo* la nivelul splinei. În zona marginală a acestui organ, pătrund prin artera splenică atât celule cât şi antigene. De aici, limfocitele *B* migrează spre foliculii limfatici unde devin, sub influenţa celulelor dendritice *(CD)*, limfocite *B* de memorie, iar limfocitele *T* populează ariile periarteriolare unde pot interacţiona cu celulele interdigitale. Nici *CD* nici limfocitele *B* nu pot endocita şi prelucra antigene particulare, această funcţie revenind macrofagelor din zona marginală. Acestea ocupă o poziţie strategică la capătul capilarelor pulpei albe, ingerând o mare parte din antigenele particulate care ajung în splină, pe care le degradează în peptide antigenice, prezentându-le limfocitelor *B, T* sau celulelor dendritice.

Limfocitele *B* aderă puternic la macrofage, între aceste două tipuri de celule stabilindu-se interreacţii foarte strânse. Celulele dendritice sunt plasate spre pereţii arteriolelor de la nivelul zonelor *T* dependente, putând veni în contact strâns cu limfocitele *T*. În acest fel, ocupă o poziţie strategică, deoarece la extremitatea interioară a foiţei periarteriolare vin în contact cu celulele dendritice, iar la cea exterioară cu celulele *B* şi macrofagele. Este posibil ca celulele dendritice să prezinte antigenul după ce a fost internalizat şi prelucrat de către alte celule APC, stabilindu-se astfel cooperări între diferite clase de APC în scopul amplificării potenţialului de informare a limfocitelor efectoare. Se pare că, contactul celule dendritice cu cele *T* are loc înaintea celui *B+T*, aceasta fiind ultima interacţie de cooperare a limfocitului *B* înainte de a deveni celulă secretorie, adică plasmocit. Ar fi deci, în special în cazul antigenelor particulate, următoarele cooperări celulare: macrofage + celule dendritice; macrofage + limfocite *B* sau *T*; celule dendritice + limfocite *B*; limfocite *B* (funcţionând ca APC) + limfocite *T* şi, desigur, limfocite *Th* + limfocite *B* sau, *Th+Tc*. Aceste cooperări pot fi secvenţiale sau simultane, interesând în aceeaşi unitate de timp două sau mai multe populaţii celulare.

## APOPTOSIS (MOARTEA PROGRAMATĂ A CELULEI)

*Apoptosis* este o formă dominantă a morţii celulare programate, un fel de program eficient de autoeliminare, de sinucidere a ei.

Această sinucidere începe cu contracţia volumului celulei, consecutiv condensării nucleului şi citoplasmei, urmată de activarea endonucleazelor, clivarea ADN-ului şi formarea de "corpi apoptotici". Un element care intervine în acest program de moarte dirijată este o transglutaminază tisulară dependentă de $Ca^{2+}$ care, acumulându-se în celule, va genera formarea de $\varepsilon$($\gamma$-glutamyl)-lizină, creşterea pragului cAMP şi a $Ca^{2+}$. Încă nu se cunosc evenimentele biochimice care reglează moartea şi nici genele care controlează aceste evenimente. Ar exista gene pentru apoptosis, ca de pildă cele care controlează sinteza proteinei apoptotice *p53* şi a transglutaminazei tisulare dependentă de $Ca^{2+}$, dintre care unele sunt exprimate funcţional, iar altele nu sunt exprimate dar pot fi induse. Aceste "gene ale morţii" ar fi contracarate de către gene ale căror produse, cum ar fi proteinele mitocondriale *bcl-2,* blochează programarea morţii celulare. Aceasta nu are loc atât timp cât se menţine un echilibru funcţional între genele apoptotice şi cele de supravieţuire.

Intervenţia unui semnal de la un factor apoptotic poate suprima exprimarea genelor de supravieţuire şi iniţia programul de omorâre a celulei. Opusul acestei situaţii este blocarea morţii prin hiperfuncţia unor gene ca *Bcl-2, c-myc, ras* etc. ce menţine la un nivel crescut rata de proliferare celulară care devine nocivă pentru organism. Se pare că alterarea balanţei între proliferarea celulei şi moartea ei, care de regulă duce la proliferări neoplazice, poate fi instalată fie printr-o accentuare a proliferării cu menţinerea ratei de deces la nivel normal, fie prin menţinerea proliferării la nivel normal şi scăderea ratei de deces.

La şoarecii transgenici care au un prag crescut de proteine *bcl-2* se înregistrează o frecvenţă crescută a tumorilor spontane, deoarece genele apoptotice sunt inhibate iar cele antiapoptotice activate. Apoptoza este un component important al reglării răspunsului imun, limfocitele *T* şi *B* stimulate devenind imediat susceptibile la moarte.

## CITOKINELE, AGENŢI DE COMUNICARE INTERCELULARĂ

Răspunsul imun este de fapt amplificarea unor funcţii consecutiv unor modificări foarte mici în balanţa homeostatică, care debutează cu reacţii locale şi se extind progresiv până când cuprind întregul organism. De la răspunsul local, care are loc la nivelul unde a penetrat antigenul, se ajunge la răspuns sistemic şi în final la restaurarea integrităţii tisulare şi funcţionale. Principalele celule implicate în aceste fenomene sunt celulele APC şi limfocitele, procesul de amplificare fiind bidirecţional: macrofagele instruiesc limfocitele care proliferează şi recrutează alte macrofage în vederea amplificării fenomenelor şi restaurării homeostaziei. Pentru a coopera între ele, celulele realizează contacte directe, principalul agent de legătură fiind antigenul şi moleculele de adeziune, precum şi diverse lectine, anticorpi etc. (fig. 180).

Dar comunicările se realizează şi la distanţă, prin mediatori solubili. De exemplu, dacă limfocitele *T* sunt stimulate cu lectine, nu proliferează clonal decât în prezenţa macrofagelor care eliberează un al doilea semnal, respectiv IL-1. Ele pot

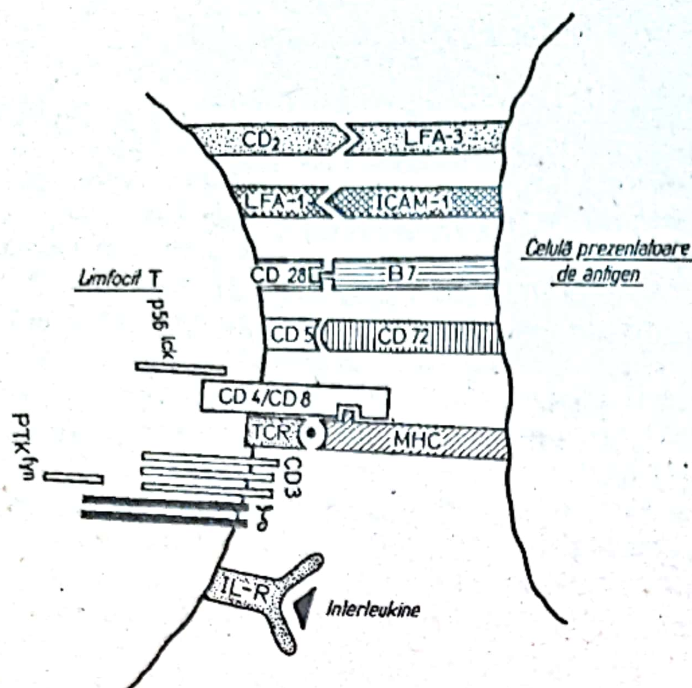



Fig.180. Două modalităţi diferite de stimulare a limfocitelor T. Acestea pot fi antrenate funcţional de către antigen (•) recunoscut specific prin receptorul pentru antigen (TCR) sub restricţie MHC, proces în care intervin diferite alte molecule de adeziune. Stimularea poate fi însă declanşată sau amplificată şi prin receptorii pentru diferite citokine, ca de pildă receptorii pentru interleukine (IL-R).

transmite acest semnal prin contact celulă-celulă, sau la distanţă. Aceas posibilitate a fost demonstrată experimental prin cultivarea limfocitelor *T* separate de macrofage printr-o membrană Millipore care permite circulaţia moleculelor, dar nu şi a celulelor. În aceste condiţii, celulele *T* stimulate policlonal proliferează, deşi nu sunt în contact strâns cu macrofagele, deoarece primesc semnale prin mediatori solubili eliberaţi de către acestea, mediatori care au putut traversa membrana despărţitoare. În cazul limfocitelor *B*, activarea poate fi realizată de către limfocitele *T*h prin "puntea de antigen" care uneşte cele două clase de celule, limfocitul *T* recunoscând gruparea purtătoare iar *B* epitopul, sau prin limfokinele secretate de către *T* care vor stimula proliferarea şi diferenţierea în diferite faze ale multiplicării celulare.

Limfokinele şi monokinele sunt "limbajul sistemului imun", fiecare dintre ele fiind de fapt un cuvânt al acestui limbaj, care se poate limita strict la un singur sens, sau la mai multe sensuri, aşa cum este cazul cuvintelor din vorbirea curentă. Dar, ca şi în cazul cuvintelor, este necesară asocierea acestora pentru a se putea obţine un sens.

Aşa cum un singur cuvânt nu poate exprima o idee complexă, nici o singură citokină nu poate dirija un proces celular. Sunt necesare două sau mai multe citokine iar relaţia dintre ele este destul de complexă, în sensul că diferite citokine pot avea aceeaşi activitate, ca de pildă IL-1 şi TNF-$\alpha$, sau se pot influenţa reciproc, cum este cazul IL-4 şi IFN-$\gamma$. Uneori, pentru realizarea unui proces mai complex, este necesară prezenţa mai multor citokine. De exemplu, macrofagele pot deveni rezistente la infecţia cu *Leishmania major* numai dacă sunt tratate cu IFN-$\gamma$ asociat cu IL-2, IL-4 sau GM-CSF. Tratarea celulelor cu alte combinaţii, ca de pildă numai cu IL-2 + IL-4 sau cu IL-2 + GM-CSF, este ineficientă, fiind obligatorie asocierea IFN-$\gamma$ cu oricare dintre cele trei citokine. Atât IL-4 cât şi IL-5, dacă acţionează separat, au o influenţă minoră asupra sintezei IgA, dar adiţia simultană a ambelor este puternic stimulată pentru celula secretoare deoarece IL-4 potenţează funcţiile IL 5.

Unele dintre limfokine au efecte antagoniste. De pildă, IL-4 stimulează sinteza de IgE şi IgG1, iar IFN-$\gamma$ o inhibă, anulând efectul stimulator al IL-4.

Citokinele mediază nu numai funcţiile imune normale exprimate umoral sau celular, dar şi reacţiile de hipersensibilitate unde inhibă sau stimulează secreţia, proliferarea şi diferenţierea diferiţilor efectori celulari, sau chiar repararea injuriilor tisulare ca urmare a stimulării sintezei de colagen şi proliferării fibroblastelor. În acest din urmă caz, diferite celule ale sistemului imun se influenţează reciproc, eliberând citokine care vor stimula creşterea fibroblastelor. Este cazul macrofagelor, celulelor LGL, limfocitelor *T* şi *B*, ale căror secreţii pot stimula proliferarea acestor celule.

Macrofagele expuse la diferiţi stimuli eliberează IL-1 care activează limfocitele *T*h ce vor elibera, la rândul lor, IL-2. Interleukina-1 induce secreţia de PDGF de către fibroblaste care vor intra în ciclul de proliferare celulară, iar TNF-$\alpha$, produs tot de către macrofage, acţionează atât ca inductor cât şi ca inhibitor al creşterii. Fibroza are loc în special în cavitatea abdominală unde macrofagele se pot asocia cu celulele mezemchimale. Şi limfocitul *T*h, secretor de IL-2 are rol important, deoarece poate stimula macrofagele în vederea exprimării genei ce va codifica pentru IL-1$\beta$, TNF-$\alpha$, PDGF, TNF-$\beta$ etc. Aşa se explică de ce în fibroza pulmonară interstiţială (sarcoidoză) este prezentă o populaţie numeroasă de celule *T*, iar la şoarecii atimici congenital *(Nu/Nu)* fibrogeneza este absentă.

Dar rolul major al citokinelor, aceşti factori solubili antigen-nespecifici în cadrul cărora sunt incluse interleukinele, interferonii, diferiţi factori de creştere etc., revine reacţiilor imune specifice, unde exercită un control complex participând la reglarea funcţională a cooperărilor celulare, începând de la nivelul organelor limfoide primare până la celula efectoare (fig. 181). Ele se leagă la receptorii celulari, generând semnale spre nucleu care vor activa sau inhiba diverse funcţii. Se realizează o adevărată "reţea" de mesageri solubili care stabilesc conexiuni multiple, începând cu celula matcă şi terminând cu celula efectoare.

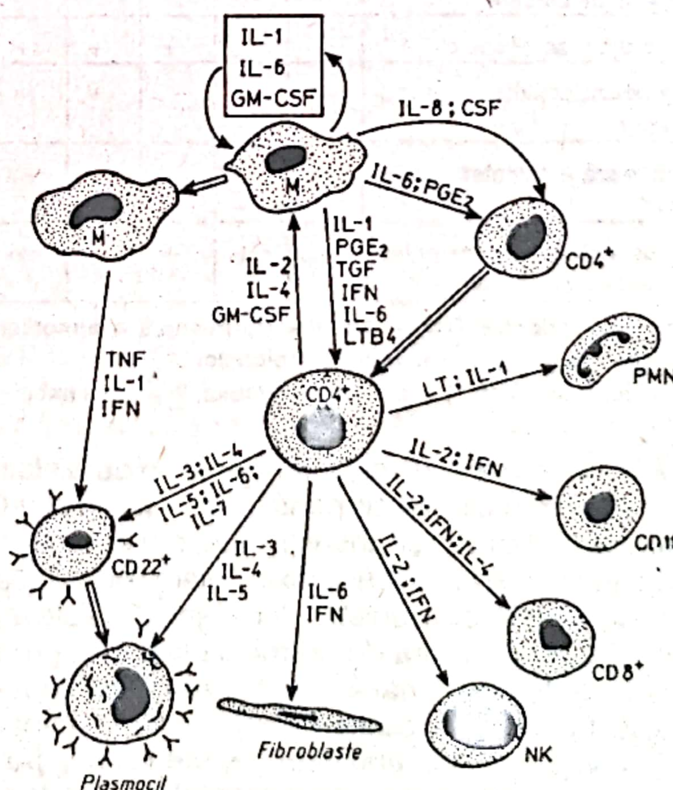



Fig.181. Semnale informaţionale între celulele sistemului imun, realizate de către diferite interleukine.
⟹ = semnale care duc la transformarea celulei;
⟶ = semnale activatoare sau inhibitoare.

*Tabelul 98*

**Diferite activităţi biologice ale unor limfokine asupra celulelor umane (după F. Balkwill)**

| Activitatea | IFN | | | TNF | LT | Interleukine | | | | | GM-CSF |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | | | 1 | 2 | 4 | 5 | 6 | |
| Citotoxicitate pentru celulele tumorale | + | + | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Citotoxicitate pentru alte celule | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Mitogen pentru celule | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Activează celulele *B* | - | - | + | - | - | + | + | + | - | + | - |
| Stimulează proliferarea *B* | - | - | ? | + | + | + | + | + | - | + | - |
| Stimulează diferenţierea *B* | - | - | + | + | + | - | + | - | - | + | - |
| Activează limfocitele *T* | - | - | - | - | - | + | - | + | - | + | - |
| Stimulează proliferarea limfocitelor *T* | - | - | + | + | + | - | + | + | - | - | - |
| Stimulează diferenţierea limfocitelor *T* | - | - | + | + | - | ? | + | + | - | + | - |
| Induce exprimarea moleculelor MHC de clasa I | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| Induce exprimarea moleculelor MHC de clasa II | - | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Activează macrofagele | - | - | + | + | + | - | + | - | + | - | + |
| Stimulează activitatea granulocitelor | - | - | - | + | + | ? | - | - | - | - | + |
| Stimulează activitatea celulelor *NK* | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - |
| Induce instalarea rezistenţei antivirale a celulelor | - | + | + | + | + | - | - | - | - | ? | - |

IFN = interferon; TNF = factorul de necroză a tumorilor; LT= limfotoxine; GM-CSF= factorul granular-macrofagic de stimulare a coloniilor;
– = lipsă de efect; + = prezenţa efectului; ? = efect necunoscut.

Activitatea lor este multiplă, mergând de la efecte mitogene pentru unele celule până la efecte citotoxice pentru altele (tabelul 98). În acest fel, ele contribuie nu numai la reglarea răspunsului imun, dar şi la deprimarea clinică a unor simptome caracteristice şocului endotoxic, infecţiilor etc. De exemplu, IL-1$\alpha$ şi $\beta$ protejează celulele matcă de iradiaţii, dar distrug celulele $\beta$ din insulele lui Langerhans. Stimulează eliberarea de hormoni pituitari şi producerea de prostaglandine, dar şi sinteza de colagenaze care provoacă distrugeri ale cartilajelor. În doze moderate, IL-1 poate acţiona ca adjuvant, poate provoca febră, somnolenţă etc. În doze mai mari provoacă anorexie, hipotensiune, putând avea chiar efect letal. În sindromul şocului septic, se realizează un lanţ de evenimente (infecţie ⟶ sinteză

crescută de IL-1 ⟶ activarea sintezei de prostaglandine, oxizi nitrici, PAF ⟶ hipotensiune), care atunci când depăşesc anumite limite pot fi nocive pentru organism.

Unele citokine pot stimula proliferarea neoplazică, ca de pildă IL-6, un potent mitogen pentru celulele mielom umane care sintetizează şi exprimă receptori pentru această interleukină; altele, ca TNF, distrug celulele neoplazice. Generate local, la locul inflamaţiei sau al răspunsului imun, ele pot avea influenţe majore sistemice în reglarea şi controlul funcţiilor de apărare imună a organismului, motiv pentru care sunt folosite, uneori cu rezultate încurajatoare, ca imunomodulatori în diferite afecţiuni care interesează sistemul imun.

# DINAMICA RĂSPUNSULUI IMUN. MECANISME EFECTOARE CARE INTERVIN ÎN NEUTRALIZAREA ANTIGENULUI

Organismul poate neutraliza agresorul prin anticorpi şi prin celule. Prima modalitate este denumită "mediată umoral" şi se realizează la distanţă de plasmocitul secretor, deoarece moleculele de imunoglobulină cu funcţie de anticorp pătrund în circulaţie şi de acolo se răspândesc în tot organismul. A doua modalitate este denumită "mediată celular" şi este efectuată direct de către celulele citotoxice.

Diferenţele sunt oarecum arbitrare, deoarece nu se poate face o delimitare categorică între imunitatea mediată umoral şi cea mediată celular. În fond, anticorpii sunt sintetizaţi tot de către celule iar acestea, pentru a ajunge în stadiul de plasmocit, primesc informaţii şi semnale ajutătoare de la alte celule.

Cu alte cuvinte, nu poate exista sinteză de anticorpi fără stimulare şi cooperare celulară. La rândul lor, celulele efectoare îşi exercită de multe ori efectul citotoxic în prezenţa anticorpilor, cum este cazul citotoxicităţii mediate celular anticorp-dependente sau al fagocitozei opsonice. Dar nici nu se poate vorbi de o prea mare asemănare între aceste două mecanisme de apărare imună. Imunitatea mediată prin anticorpi se deosebeşte mult de cea mediată celular: este transmisibilă prin ser, moleculele efectoarepot activa complementul, sinteza lor se face în condiţiile primirii de semnale de la antigen şi de la alte celule sau molecule, iar neutralizarea agresorului este foarte rapidă, fiind realizată prin aglutinare, precipitare sau liză. Imunitatea mediată celular este transmisibilă prin celule, este efectuată de către diferite populaţii efectoare cum ar fi limfocitele *T* citotoxice, celulele *NK*, *K*, macrofagele, iar distrugerea ţintei agresoare se face prin contact direct. Celulele citotoxice pot recunoaşte specific antigenul numai sub restricţie MHC, cum este cazul limfocitelor *T*c, sau pot recunoaşte antigenul în afara acestei restricţii (*NK*, *LAK*, *K*, monocite, macrofage).

Înaintea contactului cu antigenul, în organism nu există decât urme de molecule de anticorp cu specificitate pentru el, anticorpi care sunt de fapt receptori pentru antigen desprinşi de pe suprafaţa limfocitelor *B* imunocompetente dar încă neangajate. După primul contact cu antigenul, limfocitele *B* încep să sintetizeze imunoglobuline cu funcţie de anticorp, sinteză care se desfăşoară în patru etape distincte: *a) faza de latenţă; b) faza de creştere exponenţială sau "logaritmică" ,c) faza de stagnare şi d) faza de declin.*

Dinamica sintezei anticorpilor după primul stimul antigenic (stimul primar) se înscrie pe o curbă care are o pantă mai alungită către partea dreaptă (fig. 182). Imediat după contactul cu antigenul. în organism nu este perceptibilă nici o modificare. Acum este "faza de latenţă", care separă momentul contactului celulelor sistemului imun cu antigenul de momentul apariţiei primilor anticorpi. Durata acestei faze este determinată de o multitudine de factori, cum ar fi calea

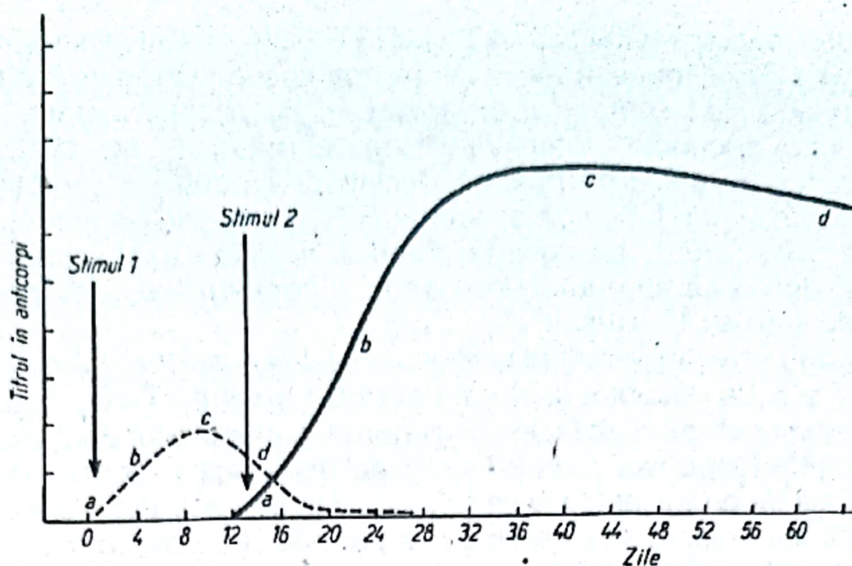



Fig.182. Dinamica sintezei anticorpilor după stimulul antigenic secundar (stimul 2).
Anticorpii din clasa IgM, de răspuns primar, scad din circulaţie (linia întreruptă) iar cei din clasa IgG, de stimul secundar (linia continuă), se menţin la un titru crescut.
a = perioada de latenţă; b = perioada de creştere logaritmică; c = faza staţionară; d = faza de declin.

de inoculare, doza de antigen inoculată, imunogenitatea lui etc. În general, această fază durează 2 - 3 zile, timp în care antigenul este fagocitat, prelucrat şi prezentat de către celulele prezentatoare de antigen limfocitelor *T* şi *B*. Acum sunt activate limfocitele *Th*, *limfocitele B*, macrofagele şi începe cooperarea celulară şi semnalizarea reciprocă.

Urmează o fază de "sinteză activă" sau de "creştere logaritmică" care durează cca. 4 - 6 zile şi în care se înregistrează creşterea constantă a titrului de anticorpi, urmată de o scurtă fază de stagnare şi apoi de una de declin. Primii care apar sunt anticorpii din clasa IgM, pentru ca după 2 - 3 zile să poată fi detectaţi şi anticorpi din clasele IgG şi IgA, al căror nivel este însă extrem de scăzut, dar care creşte pe măsură ce titrul anticorpilor IgM începe să scadă. Creşterea populaţiei de molecule IgG este asociată cu scăderea celor IgM care, după câteva săptămâni, dispar total din circulaţie.

Moleculele de imunoglobuline sintetizate după stimulul antigenic primar sunt extrem de eterogene, atât din punct de vedere al izotipului cât şi din punct de vedere al afinităţii lor. La sfârşitul perioadei de stagnare şi începutul celei de declin, în ser există molecule de anticorp din clasele IgM, IgG, IgA şi eventual IgE. După ce au dispărut anticorpii IgM, persistă, la un prag de concentraţie foarte scăzut, clasele IgG şi IgA, persistenţă care poate dura un timp variabil, de ordinul săptă-mânilor, anilor sau chiar toată viaţa. Persistenţa lor timp îndelungat este o dovadă a existenţei în organism a unui număr mic de plasmocite care mai sintetizează anticorpi cu specificitatea respectivă.

Anticorpii de răspuns primar au două caracteristici majore: aparţin predominant clasei IgM şi au o afinitate pentru antigen extrem de diferită, deoarece fiecare clonă de limfocite *B* stimulată produce anticorpi cu o anumită afinitate. Afinitatea medie a populaţiei de molecule de anticorp, la începutul răspunsului, scade către sfârşitul lui deoarece există o selecţie pentru clonele de limfocite *B* cu cea mai bună afinitate pentru antigen. Răspunsul imun primar, instalat după un stimul antigenic unic, se caracterizează prin sinteza anticorpilor IgM cu afinitate mică

pentru antigen, dar cu aviditate mare. După 12- 16 zile, ei sunt înlocuiţi cu anticorpi din clasa IgG a căror concentraţie în ser se menţine încă în limite foarte scăzute.

După un al doilea contact al organismului cu acelaşi antigen, se induce "răspunsul imun secundar", foarte diferit de cel primar (v. fig. 182). Acesta se caracterizează prin aceea că poate fi declanşat de către o cantitate mică de antigen, precum şi prin faptul că anticorpii apar rapid, ating concentraţii mari în ser, aparţin clasei IgG şi au afinitate mare şi aviditate mică pentru antigenul declanşator, deoarece au numai două situsuri combinative, spre deosebire de anticorpii IgM care au 10 situsuri.

Cel puţin două mecanisme sunt responsabile de aceste fenomene: *a)* existenţa limfocitelor *T* şi *B* de memorie şi *b)* cooperarea între limfocitele *T* şi *B*, care este eficace şi absolut indispensabilă pentru generarea anticorpilor din clasa IgG. Deci, diferenţele dintre răspunsul imun primar şi cel secundar sunt de ordin cantitativ şi calitativ. Cele de ordin cantitativ se referă la cantitatea foarte mare de anticorpi sintetizaţi în cursul răspunsului imun secundar, sinteză care se menţine un timp îndelungat în comparaţie cu sinteza "modestă" care are loc după stimulul antigenic primar. Cele de ordin "calitativ" se referă la clasele de imunoglobulină sintetizate: IgM după stimulul primar şi IgG după cel secundar. Aceste caracteristici sunt general valabile pentru orice răspuns umoral (tabelul 99).

*Tabelul 99*

**Caracteristicile răspunsului imun primar şi secundar**

| Caracterul | Răspunsul imun | |
|---|---|---|
| | Primar | Secundar |
| Perioada de latenţă | Lungă | Scurtă |
| Rata de sinteză a anticorpilor | Lentă | Rapidă |
| Titrul anticorpilor | Scăzut | Crescut |
| Persistenţa anticorpilor | Scurtă | Lungă |
| Afinitatea anticorpilor | Scăzută | Mare |
| Prezenţa celulelor de memorie | Lipsesc sau sunt foarte puţine | Prezente în număr mare |
| Clasa anticorpilor | IgM | IgG |
| Doza de antigen necesară pentru declanşarea răspunsului | Mare | Mică |

Există însă şi unele variante particulare, când la al doilea stimul antigenic se înregistrează o persistenţă prelungită a anticorpilor IgM sau apariţia precoce a celor IgG.

După stimulul anitigenic secundar, antigenul este fagocitat de către celulele fagocitare sau este reţinut de către cele dendritice din foliculii corticali ai ganglionilor limfatici şi ai splinei. Reţinerea lor la acest nivel este dependentă de prezenţa anticorpilor formaţi în cursul răspunsului imun primar. Urmează o perioadă de latenţă scurtă, cu o rată mai rapidă a sintezei şi deci un titru ridicat al anticorpilor care persistă în circulaţie un timp îndelungat. Acum are loc conversia anticorpilor IgM, slab şi tranzitoriu reprezentanţi, spre anticorpi IgG cu o mare afinitate pentru antigen; dozele mici favorizează creşterea afinităţii, iar cele mari o

defavorizează. Explicaţia ipotetică a acestui fenomen ar fi următoarea: dozele mici de antigen ar selecta numai celulele care au receptori cu afinitate mare pentru el. Aceste celule vor fi primele care vor lega epitopii şi care vor sintetiza anticorpi similari receptorilor lor, deci cu afinitate mare. În cazul unor doze mari, celulele cu afinitate mare sunt "saturate", excesul de antigen devenind accesibil şi celor cu afinitate mică, astfel că anticorpii secretaţi vor fi cu afinitate diferită: mare şi mică.

Toate acestea sunt valabile pentru antigenele timo-dependente. În cazul celor timo-independente, răspunsul primar este foarte slab, iar cel secundar, de asemenea redus ca intensitate, se caracterizează prin sinteza de anticorpi IgM şi nu IgG. Aceste antigene, mult mai rezistente la enzimele lizozomale ale macrofagelor, au proprietăţi de activatori policlonali şi, ca atare, nu antrenează proliferarea celulelor de memorie aparţinând unei singure clone, din care cauză răspunsul secundar seamănă, în privinţa intensităţii şi clasei de anticorpi sintetizată, cu cel secundar.

În cazul antigenelor timo-dependente, anticorpii care mai persistă în circulaţie după stimulul primar dispar după al doilea stimul. Se instalează o "fază negativă", caracterizată prin absenţa totală a lor datorită formării de complexe antigen-anticorp, complexe care sunt eliminate în principal prin fagocitoză opsonică.

Reacţiile rapide şi explozive care caracterizează răspunsul imun secundar sunt consecinţa "memoriei imunologice" instalată după prima întâlnire cu antigenul. Stimulul primar declanşează proliferarea clonală a limfocitelor *T* şi *B* cu receptori specifici pentru antigenul în cauză; o parte dintre aceste celule vor evolua spre funcţii efectoare, iar altă parte vor fi celule de memorie gata de intervenţie în cazul unei noi agresuni din partea aceluiaşi antigen. Dacă această agresiune are loc, intensitatea reacţiilor de apărare este mult mai violentă, deoarece numărul celulelor care intră în acţiune este mult mai mare.

Existenţa celulelor de memorie a fost demonstrată experimental prin aşa-zisul "efect de grupare purtătoare". După cum se ştie, limfocitele *B* recunosc haptena (epitopul) iar cele *T*, gruparea purtătoare. Un semnal de la haptenă şi alt semnal de la limfocitul *T* h vor activa celula *B* care va evolua spre plasmocit. Când unul dintre cele două semnale lipseşte, activarea şi evoluţia acestei celule sunt imposibile. Cu ajutorul unor antigene artificiale sau sintetice, s-a demonstrat existenţa celulelor de memorie, folosindu-se în acest scop haptene de genul dinitrofenil (DNP) cuplate cu grupări de albumină serică bovină (BSA), albumină de ou de pasăre (ovalbumină sau OVA) etc. Atunci când animalele au fost imunizate primar şi secundar cu complexul BSA-DNP, în ser au apărut anticorpi anti-DNP. După stimulul primar cu BSA-DNP şi secundar cu OVA-DNP, sinteza anticorpilor anti-DNP a fost practic nulă. Când animalele au fost stimulate primar cu gruparea purtătoare OVA iar secundar cu complexul OVA-DNP, au sintetizat anticorpi anti-DNP, deşi veniseră în contact pentru prima dată cu această haptenă. Răspunsul imun a avut loc deoarece în organism erau celulele *T* de memorie pentru gruparea purtătoare, care la un nou stimul au "focalizat" eficient epitopul DNP spre receptorii limfocitelor *B*. Efectul "grupare purtătoare" este o dovadă experimentală serioasă care atestă existenţa celulelor de memorie pe de o parte şi necesitatea cooperărilor celulare în răspunsul imun pe de altă parte. De asemenea, aceste experimente demonstrează rolul major al limfocitelor *T* în păstrarea memoriei imunologice.

Baza celulară a producţiei de anticorpi este transformarea limfocitelor *B* în plasmocite secretoare, transformare care se face ca urmare a efectului generat de către un semnal venit de la antigen şi a interacţiunilor limfocitului *B* cu alte celule auxiliare şi accesorii. Răspunsul limfocitelor *B* se realizează în trei etape distincte care corespund unor serii de semnale cu impact diferit asupra celulei stimulate. În prima etapă are loc "activarea" celulei *B* aflate în stare de repaus (faza

$G_0$). Datorită creşterii activităţii metabolice, celula începe să se mărească în volum şi să îşi exprime activ, pe suprafaţa sa, moleculele de clasa a II-a MHC, moleculele CD23 şi receptorii pentru diferite citokine, căpătând în acelaşi timp şi proprietăţi de celulă APC. Semnalul principal îl primeşte de la antigen prin imunoglobulinele de membrană din clasele IgM/IgD care au funcţie de receptori pentru antigen. Exprimarea ulterioară a receptorilor pentru citokine o face capabilă să primească mesaje secundare de la diferite molecule secretate de către celulele ajutătoare sau accesorii, care vor controla evoluţia metabolismului intracelular al fosfatidil-inozitolilor declanşată după stimul de către activarea fosfolipazei C, creşterea intracitosolică a $Ca^{2+}$ şi activarea proteinkinazei C. În această etapă, limfocitul *B* competent devine sensibil la alte semnale care vor controla etapa a 2-a "proliferativă" şi a 3-a de "diferenţiere". Proliferarea este o etapă relativ scurtă, urmată de diferenţierea terminală care se traduce prin creşterea exprimării genelor care controlează sinteza lanţurilor *L*, *H* şi *J* ale moleculei de imunoglobulină şi prin creşterea ARNm. Semnalul primit în faza iniţială din partea antigenului şi recepţionat prin receptorii pentru antigen de pe suprafaţa celulei este specific; semnalele ulterioare, primite prin contact direct cu alte celule sau prin diverse citokine sunt nespecifice, în sensul că ele operează în aceeaşi manieră asupra tuturor clonelor de celule *B*, indiferent de specificitatea de recunoaştere a anticorpilor care vor fi secretaţi de către celulă. Antigenul poate stimula direct limfocitul *B*, fără a fi necesară intervenţia celulelor prezentatoare, cum este cazul antigenelor timoindependente. Celulele prezentatoare însă "focalizează" şi prezintă antigenul limfocitelor *T* prin contact direct sub restricţia moleculelor de clasa a II-a MHC. De fapt, limfocitul *B* activat concentrează specific antigenul pe suprafaţa sa, mai ales sub formă de peptide care vor fi prezentate la rândul lor celulelor *T*. Acestea recunosc peptidele derivate din moleculele prezentate de către ele limfocitelor B în asociere cu moleculele MHC şi sunt la rândul lor activate în vederea sintezei unor citokine. În felul acesta se stabileşte o interacţie activatoare între *T* şi *B*, cu stimulare reciprocă. Limfocitele *B* sunt stimulate direct de către celulele *T* prin intermediul moleculelor MHC de clasa II, iar cele *T* primesc prin peptidele antigenului semnale activatoare pentru producerea de citokine care vor continua stimularea clonelor *B* activate (fig. 183 *A* şi *B*).

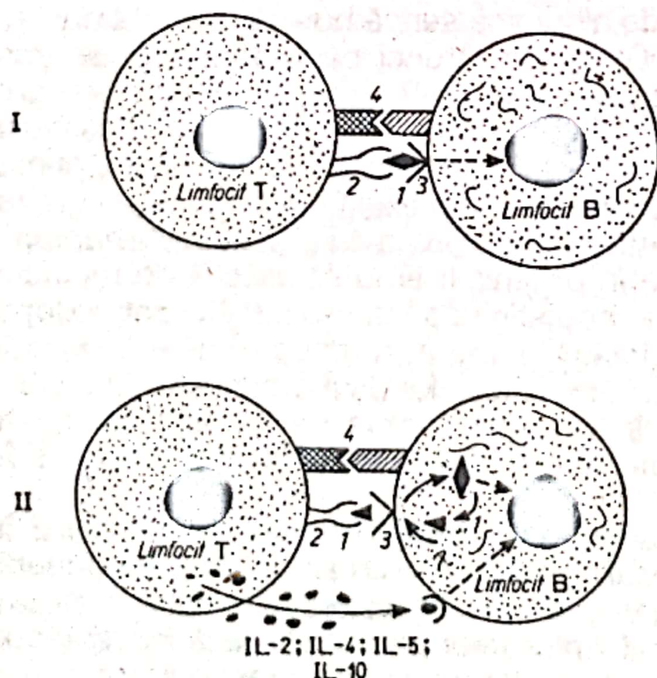



Fig.183 A. Model ipotetic care încearcă explicarea mecanismelor de activare a limfocitelor B în cooperare cu limfocitele Th ($CD4^+$).

I. Limfocitul T prezintă antigenul (1) limfo-citelor B. Acesta este fixat specific la receptorul pentru antigen de pe T(2) şi recunoscut de receptorul de pe B (3), sub restricţie MHC (4).

II. Limfocitul B prelucrează antigenul, prezentând peptida antigenică (1), fixată la receptorul de natură imunoglobulinică (3), limfocitului T(2) sub restricţie MHC (4). $CD4^+$ activat, sintetizează limfokine (IL-2, IL-4 etc.) care vor activa celula B în absenţa contactului direct cu T. Receptorii pentru antigen de natură imunoglobulinică de la nivelul celulei B, receptori din clasa IgM, fixează şi reţin antigenul atunci când acesta este în concentraţii slabe, prezentându-l limfocitelor T care, odată activate, vor produce limfokine activatoare pentru B.

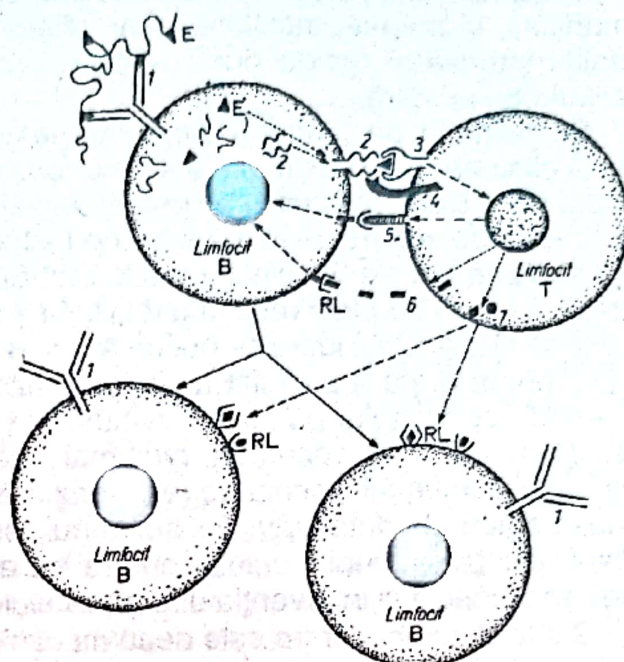



Fig.183 B. Date recente referitoare la cooperarea limfocitelor T şi B.

Limfocitul B recunoaşte epitopul (E) prin receptorul pentru antigen de natură imunoglobulinică (1). După internalizare şi prelucrare, E este asociat moleculelor MHC de clasa II (2) şi reexprimat pe membrana plasmatică, fiind recunoscut de către limfocitul T prin TCR (3) sub restricţie MHC (4).

Antigenul astfel recunoscut transmite semnale spre nucleul limfocitului T care vor stimula exprimarea pe membrana acestuia a unui ligand (5) şi secreţia de limfokine (6,7) recunoscute la rândul lor de către B prin receptori de membrană pentru ele (RL).

În urma acestui proces, se transmit semnale activatoare spre nucleul celulei B care se divide, exprimând receptori pentru unele citokine secretate de către limfocitul T activat (7) care vor controla proliferarea, diferenţierea, secreţia şi comutarea claselor de imunoglobuline (adaptare după P.D. Hodgkin şi M.R. Kehry).

.........▸ Procese de sinteză sau translocare

——▸ Procese de exprimare a unor antigene sau de proliferare şi diferenţiere celulară.

- - - -▸ Procese de stimulare şi activare.

Prin examinări minuţioase la microscopul electronic s-a observat că, în timpul contactului *T-B,* limfocitele *T* îşi orientează polul secretor către *B*, fapt care permite realizarea unei concentraţii mari de citokine în apropierea membranei acesteia. De altfel, asemenea concentraţii de molecule, cu efecte biologice bine definite la polul celulei care vine în contact cu ţinta, au fost semnalate şi în cazul celulelor citotoxice *Tc* şi *NK.* Practic, asupra limfocitelor *B* acţionează majoritatea limfokinelor secretate de către limfocitele *T*: IFN-$\gamma$, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 etc. Interleukina-2 şi IFN-$\gamma$ au efecte stimulatoare; IL-4 acţionează precoce pentru a controla căpătarea competenţei şi posibilitatea prezentării antigenului de către celula *B* prin mărirea densităţii moleculelor de clasa a II-a MHC, şi tardiv, când intervine în comutarea sintezei claselor de imunoglobuline; IL-5 se pare că ar avea rol în comutarea sintezei IgM spre IgA, iar IL-6 este un factor care intervine numai după ce limfocitul *B* a primit ajutor de la *T,* acţionând ca factor tardiv de diferenţiere. În faza de repaus, limfocitul *B* exprimă pe suprafaţa membranei imunoglobuline din clasele IgM şi IgD. După stimul, pierde receptorii IgD şi începe sinteza IgM, pentru ca în fazele ulterioare să intervină fenomenul de "comutare" a sintezei: o parte din celule înlocuiesc receptorii IgM cu receptori IgG şi devin plasmocite producătoare de molecule IgG. Comutarea claselor de imunoglobuline este controlată de către citokine. De exemplu, IL-4 este factorul esenţial care realizează comutarea de la clasa IgM la IgE, pe când IFN$\gamma$ este inhibitorul acestei comutări.

În linii mari, sinteza anticorpilor IgM de răspuns primar poate avea loc şi în absenţa cooperărilor celulei *B* cu alte celule sau molecule, antigenele timo-independente – după cum spuneam anterior – fiind molecule mari care au şi pro-

prietatea de a stimula policlonal, putând genera o asemenea sinteză. Spre deosebire de IgM, sinteza anticorpilor IgG este strict dependentă de intervenţia celulelor *T* şi de instalarea memoriei imunologice.

*Răspunsul imun mediat celular* recunoaşte aceleaşi principii fundamentale ale imunităţii, şi anume: instalarea memoriei imunologice după stimulul primar şi reacţii intense şi rapide după al doilea contact cu antigenul responsabil de stimularea primară.

De exemplu, dacă unui şoarece (A) i se grefează un fragment de piele prelevat de la alt şoarece (B), şoarecele A recunoaşte grefa ca străină şi o elimină în 2 - 3 săptămâni. După rejecţie, este grefat cu piele recoltată de la şoarecele C, străin - din punct de vedere al antigenelor de histocompatibilitate - atât de şoarecele A cât şi de şoarecele B; rejecţia are loc tot după 2 - 3 săptămâni. Dacă însă este grefat din nou cu piele recoltată tot de la şoarecele B, rejecţia se face în decurs de 5 - 6 zile. Acelaşi lucru se observă şi la o nouă grefare cu pielea şoarecelui C. Deci, prima grefă a stimulat antigenic gazda A ale cărei limfocite *T* au păstrat memoria contactului primar, dezvoltând la a doua întâlnire cu acelaşi antigen reacţii imune de tip secundar, mult mai rapide şi mai intense. Aşadar, principiul de bază al imunităţii, acela de recunoaştere specifică şi de păstrare a memoriei imunologice a contactului cu antigenul, este respectat, cu deosebirea că în răspunsul imun mediat celular nu are loc activarea sintezei anticorpilor, ci proliferarea clonală şi intervenţia directă a celulelor efectoare citotoxice.

O altă deosebire între cele două mecanisme de bază ale imunităţii este dată de către tipul populaţiei de celule efectoare implicate: în răspunsul imun mediat umoral rolul major revine unei singure celule efectoare, limfocitul *B,* care secretă imunoglobuline, pe când în cel mediat celular pot interveni mai multe tipuri de celule, cum ar fi limfocitele *T* citotoxice, celulele *NK*, celulele *K,* macrofagele etc.

Existenţa limfocitelor *Tc* poate fi pusă în evidenţă – în afară de metoda rejecţiei grefelor de organe şi ţesuturi practicată *in vivo* la animalele de laborator – şi *in vitro,* prin culturi mixte limfocitare. În acest caz, limfocitele subiectului A sunt cultivate *in vitro* cu cele ale subiectului B, diferite alogenic de A şi blocate în prealabil prin tratare cu mitomicină C sau prin iradiere (pentru a se păstra proprietăţile lor stimulante şi a se bloca capacitatea proliferativă). În decurs de 4 - 5 zile, limfocitele subiectului A, stimulate de cele B, proliferează şi devin citotoxice pentru B. Efectul lor citotoxic poate fi evidenţiat cu ajutorul celulelor ţintă B marcate cu $^{51}Cr$. Cu cât cantitatea de $^{51}Cr$ eliberată în mediu va fi mai mare, cu atât citoliza va fi mai intensă. Limfocitele *Tc* sunt $CD8^+$ cu antigenul CD2 termolabil şi recunosc antigenul sub restricţia moleculelor de clasa I MHC. De regulă, epitopii recunoscuţi de către *Tc* sunt peptide scurte, de 14 - 15 reziduuri de aminoacizi, care se leagă la moleculele HLA de clasa I. În absenţa stimului antigenic, limfocitele *Tc* circulă sub formă de celule precursoare. După contactul cu antigenul, încep activarea, proliferarea şi diferenţierea precursorilor în celule efectoare citotoxice.

Practic, există două etape diferite: *a)* etapa de diferenţiere a precursorilor în celule efectoare şi *b)* etapa de activare a citolizei propriu-zise.

Diferenţierea are loc ca urmare a semnalelor activatoare primite de la antigen şi a semnalelor accesorii primite de la IL-1, IL-2, IL-4 şi IL-6. Sunt activate fosfolipidele de membrană, încep metabolismul inozitolfosfaţilor şi activarea circulaţiei $Ca^{2+}$, activarea PKC, sinteza ARNm, a receptorilor pentru IL-2, sinteza TNF, IFN$\gamma$ şi a granulelor citolitice. Citoplasma acestor celule este bogată în astfel de granule care conţin proteoglicani şi diferite enzime.

Limfocitele efectoare *Tc* recunosc antigenul asociat cu moleculele MHC de clasa I de pe celulele ţintă prin complexul receptor-CD3 care va transmite semnale de activare (în special prin fosfolipaza C) ce vor activa cascada de evenimente intracelulare, finalizată cu producerea şi eliberarea granulelor citolitice.

În afară de limfocitele *Tc* care distrug ţinta sub restricţie MHC, citotoxicitatea mediată celular mai poate fi efectuată şi de către celulele *K* efectoare ale citotoxicităţii mediate celular anticorp-dependentă, de *NK*, *LAK* sau de către monocite şi macrofage. Celulele *NK* pot ucide linii celulare care nu exprimă deloc sau exprimă un număr foarte mic de molecule de clasa I MHC, posedând în acest scop receptori multipli şi folosind diferite strategii de recunoaştere. Ele ar fi lipsite de receptori pentru recunoaşterea antigenelor MHC. Mai mult, prezenţa în număr mare a moleculelor MHC pe celulele ţintă chiar ar inhiba recunoaşterea şi liza acesteia de către *NK* (fig. 184).

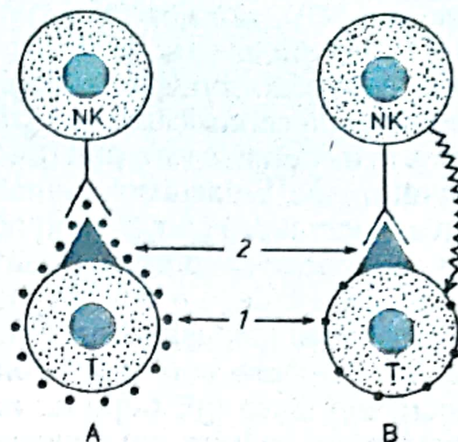



Fig.184. Modalitate posibilă de inhibiţie a activităţii citotoxice a celulelor NK de către moleculele MHC (1) exprimate abundent pe membrana celulelor ţintă (T).

A. Moleculele MHC (1) "maschează" ligandul (2) de pe ţintă, celula NK fiind în imposibilitate de a-l recunoaşte.

B. Ligandul (2) este recunoscut, proces care activează mecanismele litice NK (după L. Moretta şi col.).

Datele sunt însă discutabile, deoarece s-a constatat că există celule ţintă care, deşi nu diferă între ele în ce priveşte nivelul exprimării moleculelor de clasa I MHC, diferă în susceptibilitatea lor faţă de citotoxicitatea *NK*, de unde concluzia că ar mai interveni şi alţi factori celulari care ar influenţa funcţiile citolitice ale acestor celule efectoare.

## MECANISMELE EFECTOARE CARE INTERVIN ÎN NEUTRALIZAREA ANTIGENULUI

Mecanismele efectoare ale imunităţii mediate prin anticorpi sunt cel mai bine cunoscute. Există două modalităţi majore de acţiune: una în care anticorpul se combină cu antigenul şi îi anulează starea sa de moleculă aflată liberă în umorile organismului, şi alta în care anticorpii se fixează la antigen dar, pentru neutralizarea acestuia, este necesară intervenţia complementului.

Prima situaţie este operantă numai în cazul antigenelor moleculare şi corpusculare de genul toxinelor bacteriene, virusurilor sau bacteriilor. Acestea sunt neutralizate prin precipitare sau aglutinare, fiind "scoase" din soluţie sau suspensie şi eliminate prin fagocitoză opsonică sau prin filtrul renal. Acest gen de neutralizare prin anticorpi este rapid şi eficient, în special în cazul toxinelor şi al infecţiilor virale, fiind condiţionat bineînţeles de către numărul moleculelor de anticorp aflate în circulaţie.

Neutralizarea prin anticorpi a antigenelor complex organizate sub formă de celule sau ţesuturi se realizează pe cale citotoxică prin activarea componentelor complementului. Anticorpii se fixează la antigenele de pe suprafaţa celulei şi, odată fixaţi, îşi descoperă situsul de activare a complementului de la nivelul

domeniului $C_H2$ al fragmentului *Fc* care va implanta componentele *C* 5, *C* 6, *C* 7, *C* 8 şi *C* 9 în dublul strat lipidic al membranei celulei ţintă, formând "pori" care vor altera ireversibil condiţia fiziologică a acesteia. Procesul este cunoscut sub denumirea de citotoxicitate sau liză "complement-dependentă" şi este foarte uşor de pus în evidenţă *in vitro* prin reacţii de hemoliză. Mecanisme de acest gen sunt generate *in vivo* în cazul bolii hemolitice a nou-născutului sau în erori de transfuzie, când se inoculează sânge aparţinând unor grupe AB0 necorespunzătoare.

Un alt mecanism efector dependent de anticorpi este citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă. În acest mecanism, neutralizarea ţintei este realizată de către celula ucigaşă, dar activarea ei se face numai în condiţia legării celulei efectoare la celula ţintă prin intermediul moleculei de anticorp. Moleculele de anticorp din clasa IgE deţin un rol important în declanşarea unor mecanisme particulare de apărare, care constau din activarea eliberării de către mastocite şi bazofile a unor granule bogate în histamină şi serotonină care declanşează reacţii inflamatorii generatoare de disconfort pentru paraziţi şi bacterii, dar şi pentru organism, cunoscute sub denumirea de reacţii alergice sau de hipersensibilitate de tip imediat.

Mecanismele citotoxicităţii mediate celular se pare că sunt identice, indiferent de tipul de celulă efectoare. La toate ar fi mai multe etape care, în linii mari, constau din formarea de conjugate, de comuniuni între celule efectoare şi celula ţintă, urmată de migrarea granulelor citolitice din citoplasma celulelor citotoxice spre locul de contact cu celula ţintă, secreţia acestor granule în exterior, formarea de pori în membrana ţintei şi fragmentarea nucleului ei. După distrugerea ţintei, celulele ucigaşe se desprind, fiind pregătite să recunoască şi să ucidă alte celule ţintă. Legarea efectoarelor *T* c sau *NK* la celula care urmează să fie ucisă durează cca. 2-3 minute şi necesită prezenţa moleculelor de adeziune şi a $Mg^{2+}$, procesul fiind strict dependent de prezenţa acestor ioni. După legare, aparatul Golgi al celulelor ucigaşe se orientează rapid spre celula ţintă şi începe migrarea granulelor citolitice către zona de contact, granule preformate la *NK,* sau care încep să se formeze în endozomi la limfocitele *Tc* după stimularea acestora de către ţintă. Urmează exocitoza lor şi liza celulară ca urmare a apariţiei unor leziuni în membrana ţintei, de formă tubulară, cu diametrul variind între 5 şi 20 nm. La microscopul electronic granulele apar ca nişte formaţiuni corpusculare dense, care pot fi separate prin centrifugare în gradient de densitate. Au un perete exterior format dintr-un dublu strat lipidic şi îşi păstrează capacitatea litică şi după separare. De fapt, ele reprezintă o familie de şase serinesteraze denumite "granzime" A.F. şi de "perforine" sau "citolizine", proteine formatoare de "pori" cu diametre variabile, care au o greutate moleculară de 70 kD şi care sunt foarte asemănătoare cu componenta *C* 9 a complementului. Au două domenii bogate în Cys, dintre care unul este implicat în legarea $Ca^{2+}$, prin intermediul căruia reacţionează cu o grupare fosforilcolinică a fosfolipidelor de membrană. Prin această asociere, perforinele suferă modificări conformaţionale care duc la polimerizarea lor în dublul strat lipidic şi la formarea de "pori" în membrana ţintei, nişte canale permeabile pentru moleculele cu diametru mai mic de 9 nm. Pentru formarea unui por trebuie cel puţin 3-4 monomeri de perforine. În acest proces sunt mai multe stadii funcţionale (fig. 185).

Polimerizarea perforinelor monomer este dependentă de prezenţa $Ca^{2+}$, dar uciderea ulterioară a celulei este independentă de prezenţa acestor ioni. Formarea porilor este urmată de creşterea presiunii osmotice în interiorul celulei ţintă, datorită părăsirii ei de către ioni şi de proteinele cu greutate moleculară mică.

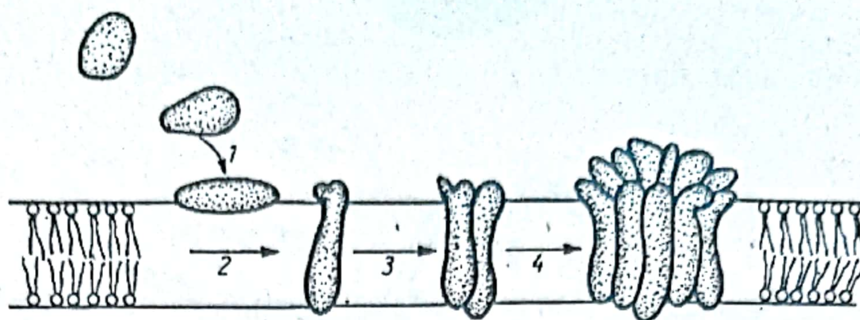



Fig.185. Secvenţa momentelor care au loc în cursul formării porilor în membrana celulei ţintă sub acţiunea perforinelor.

Perforina monomer se leagă la membrana celulară (1). După legare suferă modificări conformaţionale (2), agregă în poliperforine (3) formând pori cu diametrul de 5–20 de nm (4) (după D.M. Ojcius şi col.).

În celulă, rămân numai moleculele cu greutate moleculară mare care, în urma influxului de molecule de apă, duc la umflarea şi ruperea ei.

În afară de perforine şi granzime, granulele mai conţin enzime lizozomale (fosfatază acidă, arilsulfatază) şi proteoglicani, molecule cu greutate moleculară mare care interacţionează fizic cu perforinele şi granzimele, dar care nu ar avea rol în uciderea ţintei.

Din celulele *Tc* a fost izolată "leukoalexina", o proteină de 50 kD similară factorului de necroză a tumorilor şi limfotoxinelor, care ar fi citotoxică pentru celulele tumorale. Leukoalexina, factorul de necroză şi limfotoxinele pot ucide ţinta în absenţa $Ca^{2+}$.

Şi celula ţintă joacă un rol activ în propria ei moarte. După "lezare", sunt activate nucleazele endogene ale acesteia, un adevărat program sinucigaş care conduce la fragmentarea ADN şi la moartea celulei. De altfel, fragmentarea ADN este o altă cale esenţială de citoliză.

În citosolul celulei citotoxice există citotoxine similare factorului de necroză a tumorilor, activate de serin-esteraze care, odată ajunse în spaţiul extracelular, fie că se fixează la receptorii specifici de pe membrana plasmatică a ţintei, după care sunt internalizaţi într-o manieră similară fagocitozei opsonice, fie că vor traversa membrana celulară direct şi, odată ajunse în citosol, vor transmite semnale ucigaşe spre nucleul celulei ţintă. Este interesant faptul că perforinele şi granzimele perforează membrana celulei străine, dar nu au nici un efect distructiv asupra membranei celulei care a eliberat aceşti factori. Se pare că celulele ucigaşe nu sunt susceptibile la acţiunea litică a acestor granule, datorită existenţei unor mecanisme specifice de protecţie reprezentate de nişte proteine care ar conferi o mare rezistenţă la acţiunea distructivă a perforinelor. Aceste proteine protectoare, denumite "protectine", ar fi plasate la suprafaţa externă a membranei plasmatice şi ar inactiva spontan perforinele, făcând imposibilă inserarea acestora în dublul strat lipidic al membranei celulare. Protectinele sunt foarte active, o singură moleculă putând conferi rezistenţă celulei (fig. 186).

Liza celulei de către efectoarele citotoxice se realizează prin formarea de pori şi fragmentarea nucleului. Dar şi componentele complementului, activate pe cale clasică sau alternativă, ucid celula ţintă tot prin formare de pori. În ambele mecanisme, formarea porilor este practic identică, ea implicând adiţia secvenţială de molecule individuale de proteină la o leziune iniţială, de unde concluzia că nu pot fi trasate delimitări categorice între diferite forme ale apărării imune.

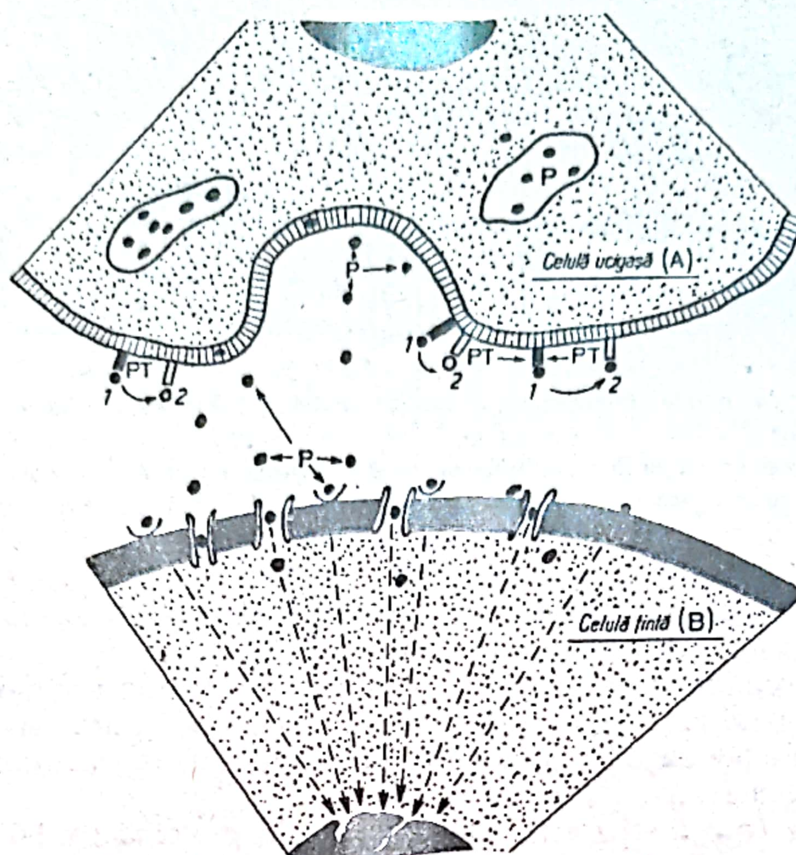



Fig.186. Eliminarea prin exocitoză a perforinelor de către celula ucigaşă (A) şi acţiunea acestora asupra celulei ţintă (B).

Perforinele (P) formează pori în membrana plasmatică sau se fixează la receptori pentru ele, transmiţând semnale distructive către nucleul celulei ţintă.

Celula ucigaşă A este protejată de efectul distructiv al acestora prin intermediul protectinelor (PT), care transformă perforinele din fază activă (1) în fază inactivă, netoxică (2) pentru celule (după A. Zychlinsky şi col.)

# ÎNCERCĂRI DE UTILIZARE PRACTICĂ A UNOR EFECTORI AI IMUNITĂŢII

Primii efectori ai imunităţii folosiţi deliberat în practică au fost anticorpii, iar scopul utilizării lor ţintea anularea efectelor unor agresiuni virale sau bacteriene. Era şi firesc ca la sfârşitul secolului trecut şi începutul acestui secol, când bolile infecto-contagioase constituiau o problemă de importanţă primordială pentru sănătatea publică, preocupările să fie orientate în direcţia combaterii acestora. Alături de vaccinuri, seroterapia a dat bune rezultate în multe boli, constituind un instrument terapeutic foarte valoros. Cu timpul, utilizarea anticorpilor a fost extinsă, fiind aplicată în medicina legală, în prevenirea anemiei hemolitice a nou-născutului, în diagnosticul de laborator etc. Efectorii imunităţii mediate celular au fost cunoscuţi mai târziu şi, ca atare, utilizarea lor practică a fost mai tardivă.

În zilele noastre, bolile infecto-contagioase, cu mici excepţii, nu mai constituie o problemă majoră de sănătate. În schimb, imunodeficienţele, bolile cronice şi în special cele neoplazice, sunt într-o ascendenţă neîntreruptă. De aceea, cercetările actuale sunt orientate spre găsirea celor mai eficiente căi de aplicare a cunoştinţelor de imunologie fundamentală în combaterea lor.

Există două direcţii principale de interes: încercările de utilizare a anticorpilor sub formă de imunotoxine şi a celor stimulate *in vitro* cu antigene tumorale pentru a deveni limfocite ucigaşe activate *(LAK)* care să distrugă eficient tumorile *in vivo.*

## IMUNOTOXINELE

Imunotoxinele sunt molecule complexe formate din anticorpi IgG cu specificitate de anticorpi faţă de unii determinanţi antigenici existenţi pe suprafaţa celulelor tumorale, la care au fost ataşaţi diferiţi factori toxici. Aceste molecule de imunoglobulină "purtătoare" de agenţi distructivi au generat numeroase speranţe şi au antrenat multe colective de cercetare în activitatea de obţinere a lor şi de evaluare a efectului lor terapeutic. Imunotoxinele sunt toxine active, conjugate cu anticorpi care "văd" antigenele de pe suprafaţa unor celule tumorale sau normale. Uneori, în loc de toxine, se cuplează la anticorpi unii izotopi puternic radioactivi. Principiul acestei metode terapeutice este acela de asociere a specificităţii anticorpului cu nocivitatea toxinei sau izotopului, adică folosirea anticorpului ca purtător de factor ucigaş. Anticorpul se va lega prin *Fab* la antigenul de pe suprafaţa celulei pe care-l va recunoaşte specific, menţinând în contact strâns cu celula ţintă "povara" ucigaşă. Deci, imunotoxina este un fel de "obuz teleghidat" care duce explozibilul direct la ţintă, pătrunde în citosol şi inactivează componentele maşinăriei de sinteză a proteinelor.

Primul care a imaginat un astfel de procedeu terapeutic a fost P.EHRLICH. Acesta a propus crearea de "gloanţe magice" ("zauberkugeln") care să fie orientate spre ţinte precise, ţinte care în mod natural, cum ar fi cazul celulelor tumorale, sunt recunoscute de către un număr mic de molecule de anticorp şi nu exprimă sau exprimă foarte puţine antigene specific tumorale.

S-a încercat folosirea anticorpilor monoclonali la care s-au legat toxine de origine bacteriană sau toxine vegetale, ca de pildă toxina difterică, toxina de *Ps. aeruginosa* (exotoxina A), de *Shigella,* toxina de ricin etc. Toxinele din plante se leagă la glicoproteine şi glicolipide care au galactoză terminal. Majoritatea sunt alcătuite din câte două lanţuri polipeptidice, A şi B, distincte funcţional şi legate între ele prin legături disulfidice. De regulă polipeptidul A este toxic, având activitate enzimatică, iar B se leagă la receptorii de pe suprafaţa celulei, nişte glicoproteine sau glicolipide al căror reziduu terminal este galactoza.

În practică, se izolează polipeptidul A şi se leagă la anticorpul monoclonal prin legături disulfidice (fig. 187), după ce în prealabil toxinele de origine vegetală au fost deglicozilate în vederea eliminării manozei pe care o conţin. În caz contrar, manoza din componenţa lor s-ar lega la receptorii pentru manoză de pe celulele sistemului reticulo-endotelial şi imunotoxina nu ar mai ajunge la ţintă. În general, imunotoxinele acţionează fie direct asupra ribozomilor inactivându-i, cum este cazul celor obţinute cu toxina de ricin sau cu alte toxine vegetale, fie prin inactivarea unor enzime necesare translocării lanţului polipeptidic de la nivelul ribozomilor, cum este cazul exotoxinelor difterică sau piocianică.

Efectul lor depinde de modul de fixare la suprafaţa celulei. După dataşare, este obligatorie endocitoza complexului şi transportul spre endozom şi aparatul Golgi. Când traversează membrana de la exterior spre interiorul celulei, fragmentul B al toxinei de ricin rămâne ataşat la receptor, iar fragmentul A se desfăşoară parţial (la *p*H acid), pătrunde în citosol unde *p*H-ul este neutru, se reînfăşoară şi îşi

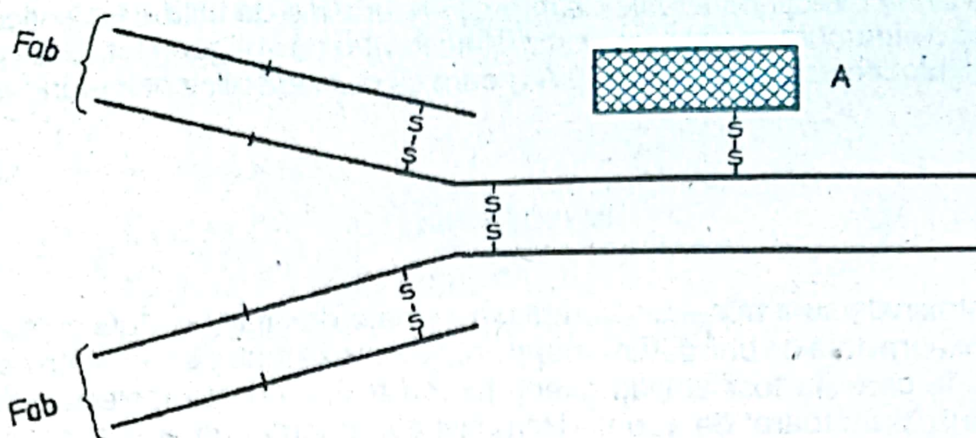



Fig.187. Principiul realizării unei molecule de "imunotoxină". Polipeptidul A din toxina de ricin este ataşat prin legături disulfidice la molecula de anticorp IgG. Prin Fab, anticorpul se fixează specific la ţintă, aducând astfel toxina în apropierea celulei sau chiar pe suprafaţa ei (după S. Olsness şi col.).

recapătă proprietăţile toxice (fig. 188). Nu întotdeauna este necesară existenţa *p*H-ului acid pentru ca toxina să poată pătrunde în celulă, uneori formându-se canale cationice în membrană care contribuie la alterarea stării funcţionale a acesteia.

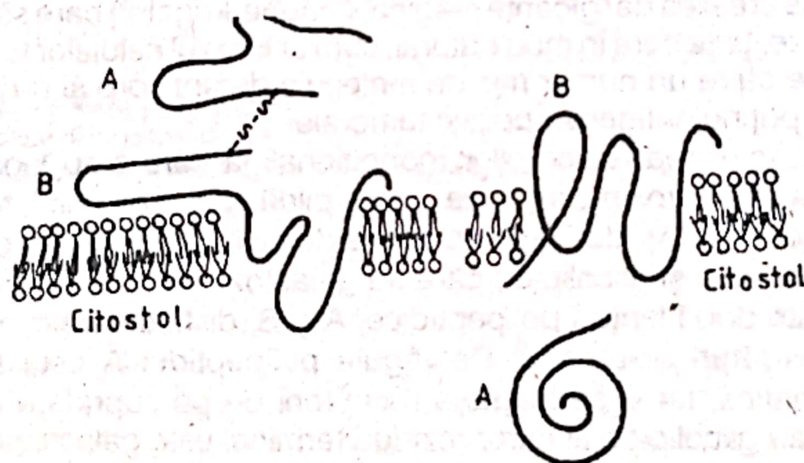



Fig.188. Modul de pătrundere a toxinei difterice intracitoplasmatic. Fragmentul B se inseră la membrana celulară iar fragmentul A se desfăşoară, pătrunde în citoplasmă unde se reînfăşoară, recăpătându-şi proprietăţile toxice care duc la formarea de pori şi canale selective pentru ioni şi, în final, la uciderea celulei ţintă (după S. Olsness şi col.).

Unele toxine au fost legate la hormoni, la IL-2, la CD4 care leagă gp 120 de pe celulele infectate cu HIV etc. Alte metode folosesc "anticorpi hibrizi" care "văd", prin situsurile lor combinative, determinanţii antigenici de pe celulele ţintă şi de pe celulele citotoxice *NK* sau *Tc*. Legarea celor două jumătăţi de moleculă de imunoglobulină se poate face cu proteina A stafilococică, realizându-se o moleculă cu două specificităţi de recunoaştere care poate fixa şi ţine strâns apropiat celula ucigaşă de victima ei (fig. 189).

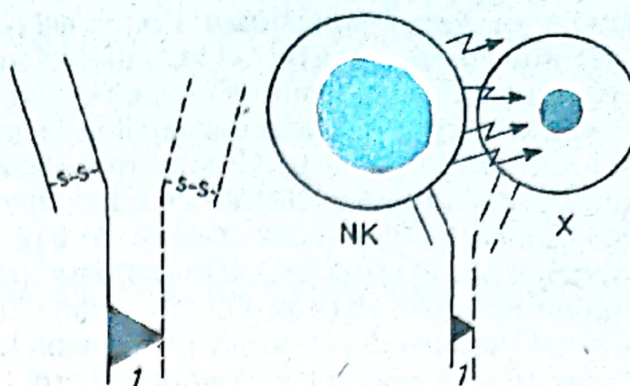



Fig.189. Principiul formării unei molecule "hibrid" de anticorp. Molecula are două situsuri combinative cu specificităţi de recunoaştere diferite; un situs recunoaşte celula NK (linia continuă), iar altul epitopii de pe celula ţintă X (linia discontinuă). Cele două jumătăţi de moleculă IgG cu specificităţi de recunoaştere diferite sunt legate între ele prin proteina A stafilococică (1). Se realizează o moleculă IgG capabilă să recunoască epitopii NK şi epitopii celulei tumorale care menţine celula ucigaşă în imediata vecinătate a celei tumorale.

Folosirea imunotoxinelor nu a dat rezultate clare, deoarece necesită unele condiţii care nu întotdeauna pot fi respectate în totalitate. Astfel, pentru a fi active, imunotoxinele trebuie să rămână un timp în circulaţie, fapt greu de realizat deoarece multe dintre ele sunt eliminate prin fagocitoză opsonică. Ele trebuie să pătrundă prin capilare în tumori, trebuie să fie internalizate de către celulele ţintă pentru a ajunge la endozomi etc. Practic toate imunotoxinele sunt imunogene, aşa că utilizarea lor repetată stimulează sinteza anticorpilor care vor neutraliza însăşi prezenţa lor, motiv pentru care administrarea lor este limitată la 1-2 săptămâni. În afară de încercările de utilizare a lor pentru distrugerea celulelor tumorale, imunotoxinele au mai fost folosite în încercarea de distrugere a limfocitelor *T* în cazul unor boli autoimune, cu scopul realizării eliminării clonelor autoreactive, a limfocitelor *B* care produc acetilcolină (în *miastenia gravis*), a mastocitelor şi bazofilelor (folosindu-se IgE la care s-au legat toxine), în alergii, pentru distrugerea unor paraziţi etc. Dar, pe cât de frumoasă şi atrăgătoare pare problema privită exclusiv teoretic, pe atât de spinoasă şi plină de capcane devine atunci când se aplică practic.

## ÎNCERCĂRI DE UTILIZARE PRACTICĂ A CELULELOR LAK

Teoretic, a fost emisă ipoteza că distrugerea *in vivo* a unei tumori imunogene poate duce la imunizarea organismului ca rezultat al instalării unui răspuns imun antitumoral dependent de limfocitele *T*.

Plecându-se de la această idee, s-a încercat stimularea specifică a limfocitelor *Tc in vitro* şi reintroducerea lor în număr mare *in vivo,* la pacientul de la care a fost prelevată tumora şi limfocitele supuse cultivării. Deoarece limfocitele *T* nu pot fi cutivate timp îndelungat *in vitro,* s-a recurs la ajutorarea lor cu IL-2 care să stimuleze exprimarea receptorilor pentru IL-2 şi implicit multiplicarea.

Pe scurt, de la un pacient care urmează a fi supus terapiei, se recoltează limfocite *T* şi un fragment de ţesut tumoral. Limfocitele sunt cultivate *in vitro* mai multe săptămâni, în mediul de cultură în care se găseşte antigenul tumoral (tumora prelucrată în mod adecvat, pentru a fi adusă până la forma de molecule libere de antigen) şi în care se adaugă IL-2 exogenă. Limfocitele proliferate sub influenţa stimulului antigenic devin "celule ucigaşe activate cu limfokine" (lymphokine activated killer cells") sau *LAK*, capabile să lizeze linia tumorală care este insensibilă la activitatea *NK*. Celulele devenite *LAK* sunt reinoculate pacientului care, desigur, nu le va respinge deoarece îi aparţin şi care, teoretic, ar trebui să lizeze tumora deoarece au fost stimulate antigenic şi au proliferat sub influenţa acesteia.

La unii pacienţi cu melanom sau cu cancere renale metastazate, au fost obţinute rezultate încurajatoare. Dar, la alţi pacienţi, ca de pildă la cei cu cancer de sân sau cu carcinom de colon, s-au obţinut rezultate neconcludente, de multe ori efecte toxice, unii dintre ei dovedindu-se refractari la această terapie *in vivo*, deşi *in vitro* tumorile lor erau susceptibile la acţiunea litică a celulelor *LAK*. Se pare că *in vivo* celulele *LAK* şi IL2 sunt mai eficiente atunci când tumorile sunt mai imunogene şi puternic infiltrate de către limfocite $CD3^+$, dar nu de $CD3^-CD16^+$, adică atunci când ele sunt infiltrate de limfocite *T* şi nu de celule *NK*. Aceasta sugerează că celulele *LAK*, distrugând tumora *in vivo*, contribuie la eliberarea de antigene tumorale care ar continua stimularea antigenică a organismului. De aceea un răspuns clinic pozitiv poate avea loc numai atunci când în organismul pacienţilor este prezent antigenul tumoral care stimulează clonal limfocitele *T* imediat după inocularea celulelor LAK şi a IL-2. Acolo unde antigenele tumorale lipsesc, rezultatele sunt negative.

Problema este însă mult mai complexă şi cu multe necunoscute, fapt care face ca această concepţie terapeutică să nu dea rezultatele scontate. Desigur că în acest proces intervin încă mulţi factori care sunt total necunoscuţi în momentul de faţă şi a căror existenţă poate că încă nici nu o bănuim.

# MECANISME DE REGLARE A RĂSPUNSULUI IMUN

Răspunsul imun este expresia unor modificări reversibile provocate de intervenţia unui stimul exogen sau endogen. De regulă, acest stimul este generat de către antigen, care deţine rolul principal, dar nu unic, în declanşarea reacţiilor de apărare. El este doar "primul impuls" care "tulbură liniştea" efectorilor imunităţii, antrenând activări sau inhibări funcţionale ca urmare a implicării diferiţilor mesageri moleculari sau celulari care vor genera stimuli adiţionali cu rol în dirijarea funcţiilor imune în general şi în controlul acestor funcţii în special. De exemplu, după un stimul antigenic primar, începe proliferarea clonei limfocitelor *B* şi transformarea lor în plasmocite, care vor sintetiza molecule de anticorp din clasa IgM ce vor recunoaşte specific determinantul antigenic incriminat. Ca urmare a acestei situaţii, în organism vor exista un număr crescut de limfocite *B* şi un prag ridicat al anticorpilor IGM care recunosc specific antigenul declanşator.

După un anumit timp, numărul plasmocitelor şi titrul anticorpilor scad, valorile revenind la limitele existente anterior stimulului. Această revenire la normal este consecinţa intervenţiei unor mecanisme de reglare. În absenţa lor, procesul reacţional ar continua nestingherit, antrenând modificări biologice profunde, incompatibile cu viaţa.

Să admitem, de pildă, că un epitop stimulează o celulă *B* care are receptori pentru el şi că, în tot organismul, clona destinată recunoaşterii acestui epitop este formată dintr-o singură celulă. Odată stimulată, ea începe să se dividă, dublându-se numeric o dată la 4 zile. Dacă proliferarea ei ar scăpa de sub control, atunci, dintr-o singură celulă, în şapte luni de zile ar rezulta o populaţie de cca. $5 \cdot 10^{15}$ celule, care ar depăşi cu de peste 50 de ori numărul normal al limfocitelor aparţinând tuturor clonelor existente în organism. În astfel de condiţii viaţa ar fi imposibilă, deoarece ar fi suficient un singur stimul antigenic pentru ca să se declanşeze o proliferare celulară care ar "sufoca" în cele din urmă toate celelalte celule şi ţesuturi ale organismului. Uneori se întâlnesc asemenea situaţii, ca de pildă în cazul unor boli leucemice, când celulele se înmulţesc anarhic generând numeroşi descendenţi inoperanţi din punct de vedere funcţional, sau în cazul unor proteine mielom, când în circulaţie există o mare cantitate de molecule nefuncţionale. Din fericire, asemenea cazuri sunt rare, mecanismele de autocontrol şi reglare menţinând reacţiile imune în limite normale.

Principalii factori care intervin în reglarea răspunsului imun sunt: antigenul, anticorpii, complexele antigen-anticorp, citokinele, celulele sistemului limfoid, diferite elemente ale sistemului nervos şi endocrin etc. (tabelul 100).

Tabelul 100

**Efectori şi mecanisme de reglare a răspunsului imun**

| Efectorii imunoreglării | Natură efectorilor | Mecanisme de acţiune |
|---|---|---|
| Antigenul | Diversă | - Doza, calea, secvenţa inoculărilor<br>- Prezenţa sau absenţa unor epitopi |
| Efectori celulari | Celulară | - Elimină excesul de antigen (PMN etc.)<br>- Macrofagele pot declanşa sau inhiba reacţiile imune<br>- Existenţa unor populaţii celulare cu funcţii diferite<br>- Durata de viaţă a celulelor efectoare<br>- Prezenţa obligatorie a tuturor populaţiilor participante la reacţie<br>- Capacitatea de secreţie a mediatorilor solubili |
| Cooperările celulare | Diversă | - Necesitatea existenţei a mai multe semnale pentru stimulare măreşte posibilitatea de control şi reglare a reacţiilor |
| Mediatori umorali | De natură imunoglobulinică | - Formează complexe cu antigenul<br>- "Maschează" epitopii anulând reacţiile<br>- Competiţionează cu diverşi mediatori umorali<br>- Reglează răspunsul imun prin reţele idiotip-antiidiotip |
| | De natură neimunoglobulinică | - Activează sau inhibă proliferarea şi funcţiile celulelor efectoare (PG, IL-2)<br>- Enzime şi hormoni care pot activa sau supresa răspunsul imun |

## ANTIGENUL CA ELEMENT DE REGLARE A RĂSPUNSULUI IMUN

Antigenul este primul reglator al reacţiilor de apărare, doarece el poate declanşa aceste reacţii, dar poate induce şi o stare de toleranţă, de supresie a lor. Modul de răspuns imun depinde de unele proprietăţi fizice sau chimice ale lui, care pot fi supresoare sau stimulatoare, realizând aşa-numita "calitate de adjuvant a antigenului".

Diferiţi adjuvanţi inoculaţi împreună cu acelaşi antigen favorizează diferite modalităţi de răspuns. De exemplu, când lipidele sunt cuplate cu antigene proteice, ele tind să se localizeze în zonele *T*-dependente şi nu în cele *B*-dependente ale organelor limfoide secundare, şi să inducă în principal reacţii de hipersensibilitate de tip întârziat şi mai slab reacţii imune mediate umoral. Aceasta sugerează că proprietăţile lipofilice direcţionează antigenul spre diferite locuri unde există populaţii de celule APC programate să declanşeze diferite modalităţi de răspuns.

În linii mari, se poate afirma că potenţialul reglator al antigenului depinde de forma sa fizică, de doză, de accesibilitatea sa la receptorii membranei celulare etc. În funcţie de diverse condiţii, aceeaşi moleculă poate induce o stare de inhibiţie sau de stimulare, motiv pentru care unii autori au propus termenul de "amfigen" în loc de "antigen". De exemplu, polimerii solubili cu masa moleculară mai mică de 100 kD nu declanşează sinteza de anticorpi faţă de epitopii lor, dar sunt puternic inhibitori ai răspunsului imun faţă de formele imunogene ale aceluiaşi tip de molecule. Dacă însă molecula are o formă globulară, cu un număr de epitopi care să fie accesibili receptorilor celulari, atunci răspunsul imun umoral poate avea loc. Densitatea epitopilor pe moleculă, forma moleculei, rigiditatea şi sarcina ei electrică, proprietăţile ei hidrofobe sau hidrofile sunt tot atâţia factori care pot influenţa şi regla răspunsul.

Aşadar, în reglarea indusă de către antigen, un rol important revine structurii lui moleculare. La nivelul lanţului polipeptidic ar exista o anumită secvenţă de aminoacizi care ar avea o afinitate particulară pentru antigenele MHC de clasa I sau II, declanşând fie activarea limfocitelor *Th*, fie a celor *Ts*. De exemplu, în cazul lizozimului neimunogen, eliminarea cu ajutorul unor aminopeptidaze a tripeptidului terminal Lys-Val-Phe poate duce la apariţia unui derivat imunogen, adică la o moleculă care nu mai induce supresie ci activare. Deci, un singur determinant antigenic poate afecta imunogenitatea întregii molecule. Se pare că antigenul îşi poate exprima funcţiile sale imunoreglatoare şi prin alte modalităţi: concomitent cu stimularea proliferării, ar stimula eliberarea unor factori supresori care pot inhiba activitatea unor celule neesenţiale pentru răspunsul imun. În felul acesta, ar asigura un echilibru homeostatic activând sau frânând o expansiune clonală excesivă, având rol în prevenirea "toleranţei de zonă joasă" - indusă de cantităţi mici de antigen, sau de "zonă înaltă" - generată de cantităţi mari de antigen. În pericol iminent de toleranţă, s-ar realiza probabil un exces de celule de memorie care să asigure posibilitatea de proliferare a celulelor efectoare, realizându-se reacţiile imune pozitive chiar şi în condiţiile existenţei unui prag scăzut de antigen. În cazul toleranţei de zonă înaltă, s-ar realiza proliferarea excesivă a celulelor *Ts*.

Totuşi, în unele condiţii, stimulul antigenic nu generează reacţii de apărare imună care să contribuie la eliminarea agresorului ci, dimpotrivă, creează o stare de acceptare, de tolerare a lui. Instalarea acestei stări este condiţionată de doza de stimul care poate fi mică, fie datorită existenţei unui număr redus de epitopi pe molecula de antigen, care nu pot asigura o intensitate stimulatorie corespunzătoare, necesară pentru antrenarea celulelor din faza de repaus $G_0$ în celelalte faze ale multiplicării, fie datorită inoculării unui număr mic de molecule care, deşi au densitatea epitopilor normală, totuşi nu pot realiza stimulul. Administrarea pe cale orală sau inocularea i.v. a antigenului, fără adjuvanţi, poate genera toleranţă. Dozele mari de antigen induc toleranţă prin antrenarea mecanismelor supresoare efectuate atât de către limfocitele *T* cât şi de către cele *B*. Acest gen de toleranţă este reversibil, după un anumit timp de la stimulul antigenic organismul recăpătându-şi potenţialul reacţional normal.

Succesiunea inoculărilor diferitelor antigene poate influenţa într-o manieră decisivă reacţiile gazdei. Se poate instala "competiţia antigenică", în care primul antigen inoculat blochează posibilitatea de reacţie a organismului faţă de antigenul inoculat ulterior. Ipotetic, supresia ar fi consecinţa activării, după stimularea organismului cu primul antigen, a unor celule supresoare, a eliberării unor factori supresori solubili sau a saturării - cu moleculele antigenului inoculat iniţial - a macrofagelor, astfel că al doilea venit nu mai găseşte suficiente celule APC disponibile. Acest gen de reglare are o mare importanţă practică, deoarece condiţionează eficienţa sau ineficienţa unor scheme de vaccinare.

Intensitatea răspunsului imun umoral este condiţionată de existenţa unui echilibru dinamic între cantitatea de antigen, complexele antigen-anticorp şi nivelul anticorpilor aflaţi în circulaţie. Rolul reglator al anticorpilor poate fi uşor pus în evidenţă experimental. De exemplu, se inoculează iepuri cu BSA (albumină serică bovină) şi cu bacteriofagul $T_2$, care nu are înrudiri antigenice cu BSA. După două săptămâni, iepurii sunt supuşi unei operaţii de plasmafereză pentru a li se îndepărta anticorpii anti-BSA aflaţi în circulaţie. Depleţia acestora duce la o importantă creştere a sintezei lor fără nici un efect asupra nivelului anticorpilor anti-$T_2$ fapt care dovedeşte că anticorpii anti-BSA din ser inhibau sinteza altor molecule de imunoblobulină cu aceeaşi specificitate de recunoaştere.

În mod normal, la începutul stimulului, moleculele de antigen sunt recunoscute de către celulele care au receptori de mare afinitate care le fixează rapid, competiţionând cu receptorii de mică afinitate de pe alte celule. Limfocitele *B* vor elibera deci în circulaţie molecule de anticorpi cu afinitate pentru antigen identică afinităţii receptorilor lor, deci anticorpi de mare afinitate. Ca atare, la începutul răspunsului imun umoral vor fi întotdeauna în circulaţie anticorpi de mare afinitate. Pe măsură ce receptorii de mare afinitate sunt "saturaţi", rămân determinanţi antigenici disponibili şi pentru celulele cu receptori de mai mică afinitate.

Anticorpii circulanţi competiţionează cu receptorii pentru antigen de pe limfocite blocând epitopii şi făcându-i inaccesibili receptorilor celulari (fig. 190). Cu cât afinitatea lor este mai mare, cu atât şi efectul lor blocant este mai evident. O parte dintre anticorpii fixaţi pe molecula de antigen solubil aflată în circulaţie se vor fixa prin fragmentul *Fc* la receptorul pentru *Fc* de pe celulele fagocitare, favorizând fagocitoza opsonică şi deci prelucrarea şi prezentarea epitopilor de către celulele APC. Dar, şi unele molecule libere de anticorp se pot fixa prin *Fc* la receptorii *Fc* ai limfocitelor *B*, expunând spre exterior situsurile combinative care vor fixa şi reţine antigenul liber. În cazul în care o parte dintre epitopii de pe molecula de antigen sunt recunoscuţi şi de către receptorii pentru antigen de pe aceeaşi celulă atunci, condiţionat de starea celulei, se transmit de la receptorii *Fc* semnale inhibitoare, care vor bloca răspunsul (fig. 191). În acest proces intervin relaţii doză-răspuns. În primele momente ale stimulului, antigenul este excedentar în comparaţie cu moleculele de anticorp, aşa că stimularea celulei se va realiza în principal prin receptorii pentru antigen de pe membrană, inducând activarea ei. O parte din moleculele de antigen sunt recunoscute de către moleculele de anticorp, care se vor fixa citofil, inducând prin receptorii *Fc* semnale supresoare. Acestea sunt primite în special de către acele celule care au receptori cu o mai slabă afinitate pentru antigen, astfel că ele vor fi iniţial supresate, pentru a permite celulelor cu receptori de mare afinitate să fie intens stimulate. Pe măsură ce moleculele de antigen rămân disponible deoarece anticorpii, aflaţi încă la un nivel

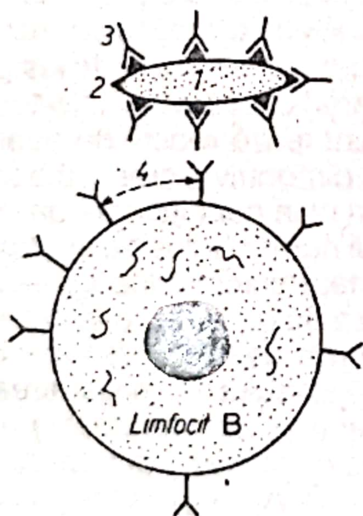



Fig.190. Modalităţi de blocare a recunoaşterii antigenului de către receptorii pentru antigen de pe membrana limfocitului B în cazul competiţiei cu anticorpi liberi din circulaţie. Molecula de antigen (1) exprimă epitopii (2) care sunt recunoscuţi specific şi "mascaţi" de către anticorpi (3). În această situaţie, epitopul (2) nu mai are acces la receptorii pentru antigen (4) de pe suprafaţa limfocitului B.

redus, au fost "epuizaţi", încep să fie stimulate şi celulele cu receptori de slabă afinitate, stimulare care are loc în condiţiile existenţei unui număr din ce în ce mai scăzut de molecule de anticorpi.

Ar părea paradoxală afirmaţia că reglarea şi controlul răspunsului imun de către anticorpi se manifestă din primul moment al stimulării antigenice, deoarece există concepţia, de altfel profund greşită, că anticorpii încep să fie secretaţi numai după stimul antigenic. Este însă bine cunoscut faptul că limfocitele *B* au receptori pentru antigen de natură imunoglobulinică care apar înaintea stimulării celulelor şi care realizează de fapt recunoaşterea specifică a antigenului. Aceşti receptori nu sunt altceva decât molecule de anticorp rămase ataşate la membrana celulei, care se pot desprinde şi ajunge în circulaţie sub formă de molecule libere. Este adevărat, numărul de molecule de imunoglobuline aflate în circulaţie înaintea penetrării antigenului este foarte mic, dar tocmai acest fapt contribuie la rolul lor reglator; iniţial există un exces de antigen şi sinteză de anticorpi din clasa IgM care favorizează semnalele pozitive, pentru ca mai târziu să se instaleze conversia spre moleculele de IgG care ajung în exces şi care sunt sursa majoră de reglare negativă a semnalelor primite de către limfocitele *B* de la receptorul *Fc*. Izotipul anticorpilor are un rol hotărâtor; în general, anticorpii din clasa IgM stimulează răspunsul imun, iar cei aparţinând clasei IgG îl inhibă. Moleculele de imunoglobulină aparţinând clasei IgM stimulează răspunsul imun atât faţă de antigenele particulate cât şi faţă de unele antigene solubile, cum ar fi ovalbumina (OVA) sau hemocianina (KLH). Stimularea este antigen-specifică, fiind condiţionată de concentraţia antigenului sau a anticorpilor şi de secvenţa inoculărilor. Anticorpii inoculaţi înainte de antigen induc supresie pentru că, probabil, maschează epitopii (în cazul antigenelor celulare), iar cei inoculaţi după antigen stimulează răspunsul, stimulare care se pare că este dependentă de prezenţa complementului.

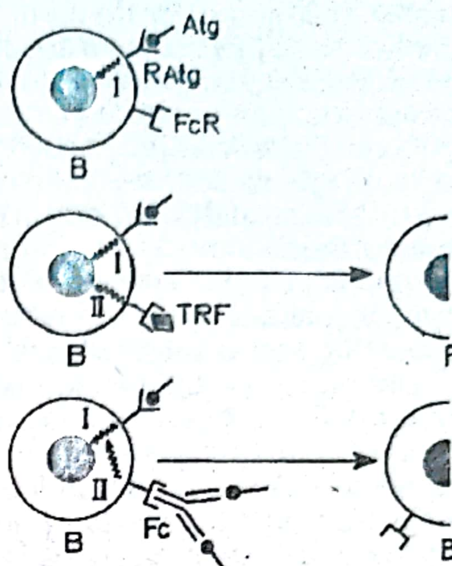



Fig.191. Mecanisme ipotetice de reglare a funcţiilor celulei B de către anticorpi sau alte citokine.

*a.* Pentru ca limfocitul B să fie activat, sunt necesare două semnale: unul de la antigen (semnal I) şi altul de la receptorul Fc (semnal II). În cazul când este prezent numai semnalul I transmis prin receptorul pentru antigen (RAtg), celula nu este antrenată din faza de repaus $G_0$.

*b.* În cazul în care se primeşte un semnal de la antigen prin RAtg (semnal I) şi altul prin FcR de la o limfokină eliberată de către limfocitul T (TRF=factorul de înlocuire a celulei T), se realizează cele două semnale activatoare şi celula evoluează spre plasmocit (p).

*c.* În exces de anticorpi, care vor forma complexe cu antigenul, FcR este ocupat de Fc al moleculei de imunoglobulină. Se va transmite un semnal inhibitor pentru semnalul I şi limfocitul B nu va mai evolua spre celule formatoare de anticorpi, ci spre celula B de memorie.

Complexul antigen + IgM ar activa complementul, care ar contribui la stimularea limfocitelor *B* legând încrucişat anticorpii fixaţi prin *Fc* la receptorii *Fc*, receptorii pentru antigen şi receptorii pentru complement. Aşa s-ar explica de ce persoanele cu deficit ereditar de complement au un răspuns imun mediat umoral, la stimuli cu antigene timo-dependente, mai slab decât persoanele normale.

Moleculele de IgG inhibă atât generarea celulelor efectoare, respectiv plasmocitele, cât şi a celor de memorie. Există însă un prag de densitate a legării moleculelor de IgG sub care anticorpii nu mai pot induce supresia. De asemenea, este necesar ca receptorii pentru *Fc* ai celulelor să fie intacţi, fapt care dovedeşte fără echivoc rolul acestora în instalarea supresiei de către anticorpi. De altfel, a fost dovedit faptul că *F(ab')* este de 1 000 de ori mai puţin supresor decât molecula intactă de IgG, iar aceasta, atunci când este neglicozilată, nu mai este supresoare pentru că nu se mai poate lega la receptorul *Fc*. Se pare că supresia prin IgG este rezultatul legării încrucişate a receptorului Fc$\gamma$RII cu receptori pentru antigen, cei pentru complement având un rol minor în acest proces, spre deosebire de activarea realizată de IgM, unde stimularea este rezultatul legării încrucişate a receptorilor pentru antigen cu cei pentru complement.

Reintroducerea antigenului în organism în situaţii de exces de anticorpi nu mai este urmată de stimularea răspunsului imun, fapt care şi-a găsit unele aplicări practice. De exemplu, inocularea de anticorpi anti-*Rh* (seroterapie anti-D) previne bola hemolitică a nou-născutului. Practic, se previne imunizarea *Rh* a mamei de către eritrocitele fetusului *Rh*$^+$ prin inocul pasiv de IgG anti-antigene D de *Rhesus,* imediat după naştere. Supresia indusă este antigen-specifică, anticorpii IgG fiind activi numai faţă de antigenul recunoscut specific de către situsurile combinative ale anticorpilor.

Există şi situaţii în care anticorpii au efect protector nu pentru organismul gazdă, ci pentru structurile non-proprii, când "facilitează" proliferarea unor bacterii sau persistenţa grefelor de ţesut normal sau neoplazic. Este cazul grefelor de organe sau de tumoră, care în prezenţa anticorpilor au o durată de rejecţie mai prelungită sau o proliferare mai accelerată. Toate acestea sunt consecinţa "mascării" determinanţilor antigenici de către anticorpi, mascare care pune în imposibilitate recunoaşterea agresorilor de către celulele efectoare (vezi fig. 190).

### Reglarea prin anticorpi anti-idiotip

Este cunoscut faptul că un limfocit sintetizează un singur tip de moleculă de imunoglobulină, cu o anumită secvenţă a aminoacizilor în regiunea hipervariabilă a situsului combinativ *(SC)*. Acest fapt face ca toate moleculele sintetizate de către o clonă de celule limfoide să recunoască un singur epitop şi, ca atare, să-şi exprime o structură complementară acestui epitop care va fi recunoscută de către celelalte celule ale organismului ca non-proprie. Partea internă a *SC*, care leagă epitopul, a fost denumită "paratop", iar specificitatea antigenică generată de paratop datorită formei sale particulare, "idiotip". Idiotipii sunt determinanţii antigenci de la nivelul *SC*, unii fiind situaţi în interiorul paratopului, alţii la exteriorul lui (fig. 192). Identificarea celor aflaţi în interiorul sau exteriorul paratopului se poate realiza prin inhibiţia cu haptene. Dacă sunt în interior, haptenele inhibă

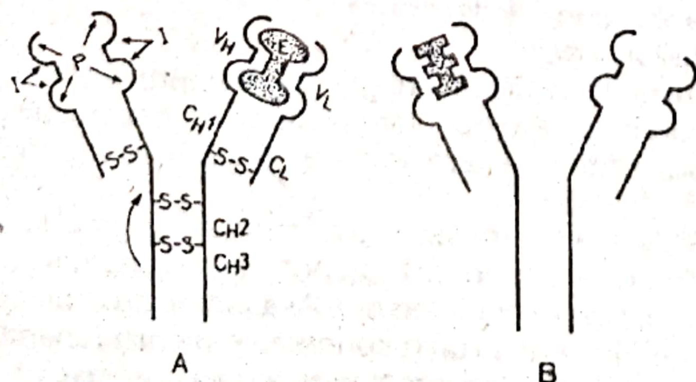



Fig.192. Anticorpii anti-idiotip, prin paratopul (P) de pe "faţa internă" a situsului combinativ ($V_H$+$V_L$), sunt complementari epitopului (E) pe care-l recunosc specific, luând forma exterioară (I), deci idiotopul, similară acestuia.

A. Anticorp anti-idiotip cu specificitate pentru epitop (E).

B. Anticorp anti-idiotip fără specificitate pentru epitop.

recunoaşterea lor de către anticorpii anti-idiotip, deoarece sunt recunoscute şi fixate de *SC* al moleculei de anticorp. Dacă sunt situate la exterior, pretratarea anticorpilor cu haptena specifică nu inhibă recunoaşterea lor de către anticorpii anti-idiotip.

Întreaga teorie este cunoscută sub denumirea de "teoria reţelei", deoarece sistemul imun apare ca o reţea de molecule de imunoglobulină, care recunosc specific alte molecule de imunoglobulină. În această "reţea" paratopul va recunoaşte specific epitopul imunogenului, devenind la rândul său determinant antigenic, adică idiotip care va stimula sinteza altor molecule de imunoglobulină cu paratopi specifici idiotipului nou-format. Conform acestei teorii, un antigen induce sinteza de anticorpi $A_1$ cu o secvenţă a aminoacizilor unică la nivelul situsului combinativ ($I_1$ adică idiotip$_1$). Dar acest $I_1$ este imunogen pentru organism. El stimulează sinteza anticorpilor $A_2$ cu $I_2$ care au specificitate anti-$I_1$, dar stimulează sinteza anticorpilor $A_3$ care vor exprima $I_3$. Deci organismul, care sintetizează molecule de imunoglobulină cu funcţie de anticorp faţă de un anumit antigen, recunoaşte aceste molecule ca străine şi produce alte molecule care le neutralizează. Ca atare, o moleculă de anticorp este recunoscută drept antigen de către limfocitele altei clone care o vor considera "străină" şi vor sintetiza anticorpi faţă de ea. Se formează o adevărată "reţea" în care, pe lângă limfocitele *B*, sunt implicate şi limfocitele *T*, deoarece exprimă receptori pentru antigen cu situs combinativ identic celor existenţi pe receptorii de natură imunoglobulinică de pe limfocitele *B*. Toate aceste elemente interacţionează şi se menţin într-o stare de perfect echilibru. În momentul în care intervine antigenul, acest echilibru este dereglat, se declanşează răspunsul imun şi sinteza de anticorpi de "generaţia $A_1$". Aceşti anticorpi, datorită idiotipului lor particular, de formă complementară epitopului, vor stimula producerea de $A_2$, a căror conformaţie este identică epitopului. În acest fel, molecula de anticorp, generată ca răspuns specific la un antigen, neutralizează antigenul şi generează prin însăşi structura ei un nou stimul antigenic. Aşadar anticorpii $A_2$ sunt ei înşişi determinanţi antigenici sau, cum se mai numesc, determinanţi anti-idiotip, faţă de care organismul poate produce anticorpi anti-anti-idiotip sau $A_3$ care vor fi similari structural cu $A_1$, astfel că ciclul se închide, în sensul că anticorpii $A_1$ recunosc epitopul şi-l neutralizează, $A_2$ neutralizează la rândul său pe $A_1$, fiind similari conformaţional cu epitopul, iar $A_3$, similari cu $A_1$, neutralizează pe $A_2$ care pot realiza, datorită asemănărilor lor cu antigenul, stimulul antigenic specific. Aşadar, moleculele de imunoglobulină prin anticorpii anti-idiotip $A_2$ pot mima morfologia oricărei molecule străine care pătrunde în organism şi se manifestă ca un antigen.

Anticorpii anti-idiotip au rol reglator. Inoculaţi în doze mari, blochează sinteza anticorpilor. În doze mici, stimulează răspunsul imun pentru că participă alături de epitopi, cu care se aseamănă perfect, la stimularea antigenică, evitând printre altele instalarea toleranţei de zonă joasă, atât la nivelul limfocitelor *B* cât şi la nivelul limfocitelor *T*. Se transmit de la mamă la fetus.

Teoria reţelei este confirmată de către o serie de date experimentale. Astfel, s-a demonstrat că determinanţii idiotipici pot induce sinteza anticorpilor anti-idiotip chiar şi atunci când imunizările se fac în sistem singenic sau autolog, ceea ce denotă că limfocitele recunosc idiotipia imunoglobulinelor izologe sau autologe. Mai mult decât atât, recent s-a demonstrat că anticorpii $A_2$, identici ca formă epitopului, pot fi folosiţi ca imunogene, respectiv ca vaccinuri. Până în prezent s-au încercat astfel de vaccinuri în rabie, hepatită epidemică etc. Ele sunt lipsite de inconvenientele pe care le au vaccinurile naturale deoarece, în loc de agenţii infecţioşi respectivi, stimulul este dat de către anticorpii anti-idiotip $A_2$. De

asemenea, recent a fost demonstrată existenţa clonelor de limfocite *T* care recunosc determinanţii idiotipici intrinseci, fapt care confirmă valabilitatea acestei teorii nu numai în cazul imunităţii umorale, dar şi în cazul celei celulare.

În general, reglarea idiotipică este importantă la organismele tinere, în perioada imediat post-natală, când are loc stimularea clonelor virgine. Ulterior, intervin alte mecanisme de reglare, mult mai operante.

**Reglarea prin complexe antigen-anticorp**

Recunoaşte practic aceleaşi mecanisme funcţionale ca şi anticorpii circulanţi, complexele putând activa răspunsul imun prin facilitarea fagocitozei opsonice şi activarea prezentării antigenului de către celulele APC. Pot însă inhiba răspunsul imun prin legarea încrucişată a receptorilor pentru antigen cu receptorii pentru *Fc* de la nivelul limfocitelor *B*.

Capacitatea imunoreglatoare a complexelor imune asigură sistemul imun cu un mijloc de control potent. Factorii reumatoizi (Ig anti-*Fc* a Ig) şi anticorpii anti-idiotip (Ig anti-*Fab* a Ig) sunt exemple de liganzi cu capacitate potenţială de interferare a reacţiilor imune cu efecte reglatoare negative sau pozitive. În exces de complexe antigen-anticorp se instalează deviaţii grave ale răspunsului imun care depăşesc limitele fiziologice normale (vezi "Hipersensibilitatea imediată de tip III").

## REGLAREA PRIN CITOKINE

Citokinele sunt principalii factori de reglare a reacţiilor imune care intervin în mod hotărâtor atât în activarea cât şi în supresia sau orientarea acestora. Deoarece ele acţionează în interdependenţă unele cu altele, formează o adevărată reţea de mesaje biochimice care controlează atât proliferarea celulelor cât şi funcţiile lor.

De exemplu, prezenţa antigenelor activează macrofagele care nu numai că le vor prelucra şi prezenta sub restricţie MHC limfocitelor *T* sau *B*, dar se vor elibera şi diverse monokine, ca de pildă IL-1 care vor acţiona ca nişte co-semnale pentru limfocite. Limfocitele *T* stimulate de către antigen sintetizează IL-2 care va activa exprimarea propriului receptor. Pe lângă IL-1, macrofagele activate transmit semnale spre *T* prin IL-6, $PGE_2$, $LTB_4$ etc., sau spre *B*, unele dintre ele fiind activatoare iar altele inhibitoare. O parte din citokine, ca de pildă TGF-$\beta$ sintetizat de diferite celule şi în special de către macrofage, sau IFN-$\gamma$ sintetizat de limfocitele *T* activate, au efecte inhibitoare; altă parte, ca IL-2, au efecte activatoare asupra proliferării limfocitelor. Unele acţionează antagonist iar altele sinergic. Astfel, TGF-$\beta$ inhibă sinteza IL-2 şi IL-6, interferonul-$\gamma$ inhibă sinteza IL-4, în timp ce IL-4 şi IL-6 sunt inductori ai sintezei IL-1. Interleukina-5 acţionează sinergic cu IL-4 în sinteza IgG1 şi cu IL-1 şi IL-2 în sinteza IgM, IL-6 acţionează sinergic cu IL-1, IL-2, IL-3 etc. Efectul lor depinde şi de pragul concentraţiei în ser sau ţesuturi. De pildă, numeroase citokine cunoscute pentru proprietăţile lor de activare a unor funcţii imune, ca IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 etc., atunci când sunt sintetizate în cantităţi mai mari decât normal, sunt capabile de a-şi inhiba fie propria lor sinteză, fie exprimarea propriului receptor, realizând un proces de autoreglare şi autocontrol care frânează răspunsul imun fie direct, fie prin activarea unor hormoni imunodepresori de genul progesteronului sau glucocorticoizilor. Prostaglandinele, derivate din degradarea fosfolipidelor membranei celulare prin calea ciclooxigenazică, activează cAMP prin intermediul căruia reglează răspunsul imun. Ele inhibă

eliberarea IL-1, această limfokină "pivot" a cooperărilor celulare, TNF-$\alpha$ care reglează citotoxicitatea, IL-2 cu rol în expansiunea clonală a limfocitelor T etc. Reglarea negativă exercită şi alte molecule cu rol în procesele inflamatorii ca LTB4, histamina, serotonina etc.

Mecanismele lor de acţiune sunt complexe şi încă insuficient cunoscute. Se pare că intervin la diverse nivele ale transmiterii semnalelor de la receptorii de suprafaţă către un nucleu, activând sau întrerupând lanţul biochimic informaţional. De exemplu, IL-4 produsă de către limfocitul *Th* activat poate anula efectul inhibitor al semnalelor primite de la receptorul *Fc* de către limfocitele *B* ca urmare a legării încrucişate a acestuia cu receptorul pentru antigen. Întreruperea acestui mesaj permite activarea limfocitului *B* chiar în condiţiile în care există deja în circulaţie un anumit prag al complexelor antigen-anticorp, care ar fi inhibitoare pentru evoluţia celulelor *B* spre plasmocit. Această evoluţie este întreruptă de-abia atunci când limfocitul *T* revine la faza $G_0$ şi nu mai secretă limfokine. Desigur, celulele efectoare ale imunităţii sunt influenţate de către o populaţie numeroasă de molecule de citokine care acţionează nu numai asupra celulelor din seria limfoidă sau mieloidă ci şi asupra altor populaţii cu rol nespecific în apărarea imună. De pildă, IL-3 induce eliberarea histaminei de către bazofile, acţionând probabil via IgE (îndepărtarea IgE de pe suprafaţa celulelor anulează efectul activator al IL-3), dar nu printr-o acţiune directă, ci prin intermediul altor molecule secretate de către bazofile sub influenţa acestei limfokine. TNF-$\alpha$ activează procesele oxidativ-respiratorii şi secreţia moleculelor active de oxigen, ca urmare a reducerii pragului cAMP la granulocitele PMN, reducere urmată de reorganizarea filamentelor de actină şi activarea capacităţii de ataşare la suprafeţe a acestor celule.

Toate acestea subliniază importanţa profundă a activităţilor biologice exercitate de către citokine în general şi interleukine în special. Ele acţionează complex, asupra tuturor compartimentelor de apărare imună.

În fond, organizarea sistemului imun poate fi comparată cu cea a creierului. Omul are un creier "arhaic", telencefalul, care a funcţionat şi funcţionează la vieţuitoarele rămase pe trepte inferioare de dezvoltare, asigurând realizarea proceselor vitale esenţiale: inervarea motorie şi senzitivă a organelor esenţiale şi recepţionarea informaţiilor din mediul extern. Peste el s-a "suprapus" o formaţie cerebrală evoluată, emisferele cerebrale ale encefalului care asigură procesele complexe biologice, inclusiv activitatea raţională, capacitatea de înmagazinare (memorie) etc. În fond, şi sistemul imun este format din două "compartimente": unul "arhaic", capabil să recunoască şi să distrugă nespecific agresorul străin de organism, compartiment alcătuit din celule fagocitare şi celule implicate în procesele inflamatorii (granulocite PMN, eozinofile, bazofile, mastocite) şi altul "evoluat", aparţinând seriei limfoide, care are inventariate toate posibilităţile de exprimare antigenică existente în natură. Acest sistem "evoluat" este format din populaţii (clone) de celule capabile să recunoască specific agresorul şi să păstreze memoria contactului cu el. Existenţa acestor două compartimente diferite se poate uneori observa în clinică: la pacienţii cu imunodepresii grave dobândite sau congenitale, există o activare impresionantă a funcţiilor PMN asociată cu o scădere sau absenţă totală a funcţiilor limfocitelor *T* sau *B*.

Citokinele controlează şi reglează funcţiile tuturor efectorilor nespecifici şi specifici ai apărării, contribuind poate în cel mai înalt grad la menţinerea funcţiilor acestora în limite normale.

## Reglarea prin alte molecule

Majoritatea hormonilor pot modula activitatea granulocitelor şi în special a limfocitelor. Astfel, estrogenii pot mări producţia de anticorpi anti-ADN, hormonii de creştere stimulează proliferarea celulară, encefalinele contribuie la controlul răspunsului imun de către sistemul nervos, iar hormonii tiroidieni, progesteronii şi în special glicocorticoizii sunt puternic inhibitori ai răspunsului imun. Efect reglator au şi moleculele de alfa-globuline, ca de pildă alfa-fetoproteine, alfa1-antitripsina, fetuina, care deprimă reacţiile imune mediate umoral şi celular, contribuind la blocarea fiziologică a rejecţiei grefei fetale de către organismul matern. Proteina C reactivă, proteina S de "fază lungă" alfa$_2$-macroglobulina şi alte proteine care apar în procesele inflamatorii sau neinflamatorii sunt participante la reglarea imunităţii.

### MECANISME REGLATORII DATORATE COOPERĂRILOR CELULARE

Diferitele modalităţi de cooperare celulară pot avea rol reglator prin însăşi existenţa lor. De exemplu un limfocit, pentru a se divide, are nevoie de cel puţin două semnale; unul de la antigen şi altul de la o celulă ajutătoare. Prin acest sistem, reacţia celulei poate fi abolită sau amplificată atât de către factori care intervin asupra antigenului care emite semnalul I, cât şi de către cei care intervin asupra celulelor ajutătoare sau mediatorilor solubili generatori ai semnalului II. În acest fel, cooperările celulare amplifică mijloacele de control şi reglare, dublând posibilitatea de intervenţie a factorilor reglatori. Spre deosebire de celulele cu dublă funcţionalitate – efectoare şi reglatoare – cum este cazul macrofagelor sau limfocitelor *B*, există celule care exercită exclusiv funcţii efectoare. Existenţa acestora este uşor de demonstrat *in vivo:* dacă şoarecii iradiaţi letal sunt reconstituiţi cu celule provenite din splina şoarecilor normali, vor răspunde normal la stimulii antigenici, dar dacă sunt reconstituiţi cu celule provenite din splina animalelor tolerante pentru antigenul respectiv, nu vor răspunde pentru că au primit celule *T*s. Există un sistem direct de comunicare intercelulară, prin "punţi de antigen" şi un sistem indirect, prin molecule eliberate de limfocitele *T*, macrofage etc.

Se ştie că limfocitul *Th* poate fi activat numai în condiţiile în care informaţia despre antigen, respectiv semnalul I, este transmisă de către o celulă accesorie care exprimă moleculele MHC de clasa II, ca de pildă antigenele DR la om, identice cu cele ale celulei *T*h. În caz de incompatibilitate MHC, semnalul II costimulator nu poate fi transmis şi cooperarea nu mai poate avea loc. Dar populaţia de celule este eterogenă din punct de vedere al moleculelor de clasa II a MHC, din cauză că la nivelul macrofagelor operează două direcţii de circulaţie a informaţiilor: o direcţie merge de la macrofage către limfocitele *T*h, iar altă direcţie, *de la T*h către macrofage. Iniţial, celula accesorie antrenează un circuit amplificator, pentru ca ulterior să sufere influenţa inhibitorie a acestui circuit, care va aduce o tranziţie de la un fenotip DR$^+$ la altul DR$^-$. Această tranziţie dinamică nu defineşte o populaţie sau populaţii stabile de macrofage, ci mai degrabă stadii diferite de dezvoltare, ca expresii ale unor relaţii de reglare şi control pe care le induce, dar care se răsfrâng asupra lor, jocul DR$^+$/DR$^-$ fiind responsabil de deosebirile existente în ce priveşte potenţialul de prezentare a antigenului. O celulă DR$^+$, chiar dacă a fagocitat antigenul, nu poate coopera decât cu acea celulă *T*h căreia îi poate

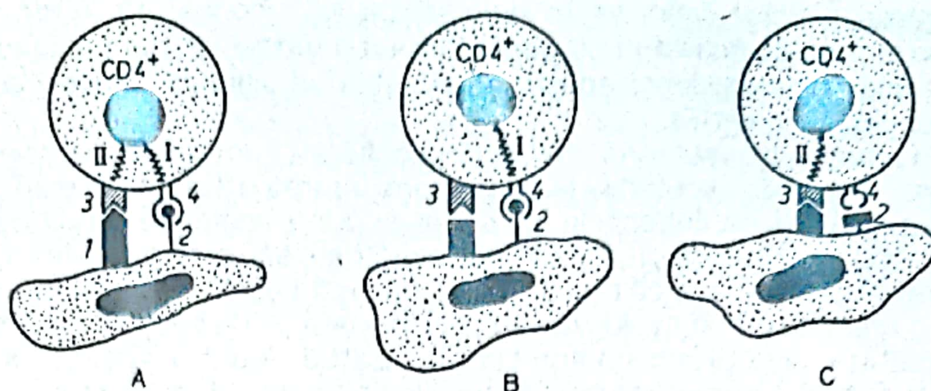



Fig.193. Modalităţi posibile de reglare a răspunsului imun prin cooperări celulare.
A. Limfocitul Th ($CD4^+$) este activat numai în condiţia în care primeşte două semnale; semnalul I de la antigen (2) prin receptorul pentru antigen (4), şi semnalul II de la MHC (1) al celulei APC prin laturile $\alpha\beta$ ale CD4 (3). Lipsa MHC de pe celula APC corespunzătoare speciei (B) sau prezentarea unui antigen care nu corespunde receptorilor de pe membrana celulei T (C) nu este urmată de activarea acesteia, deoarece, nu se poate asigura semnalul II, respectiv I.

transmite semnalul II (fig. 193). În afară de relaţiile care se stabilesc între celulele participante la răspunsul imun şi care influenţează exprimarea DR, mai pot interveni şi alţi factori. De exemplu unii agenţi derivaţi din microorganisme, cum ar fi zimozanul din *Sacharomyces cerevisiae* sau endotoxinele colibacililor, reduc numărul macrofagelor $DR^+$ şi, implicit, dezvoltarea reacţiilor imune.

Intervenţia limfocitelor *T* inductoare, ajutătoare, amplificatoare, supresoare sau contrasupresoare a devenit evidentă în cursul cercetărilor care urmăreau efectul transferului de celule recoltate de la animale normale asupra celor tolerante sau iradiate letal. Cu această ocazie s-au putut stabili următoarele:

1. Răspunsul imun faţă de antigenele timo-independendente creşte după tratamentul animalelor stimulate cu ser antilimfocitar. Deci, serul distruge limfocitele *T*s şi favorizează funcţiile limfocitelor *B*.

2. Se poate induce supresia alotipică la animale normale dacă li se inoculează limfocite *T* provenite de la animale care au supresie alotipică cronică. *In vitro,* celulele animalelor normale sunt inhibate în răspunsul lor dacă sunt cultivate împreună cu limfocitele *T* ale animalelor supresate. Deci, animalele supresate au în exces limfocite *T*s.

3. Limfocitele *T* stimulate *in vitro* cu ConA suprimă răspunsul imun al celulelor normale, deoarece ConA activează proliferarea *T*s.

4. Animalele "nereactive" genetic au predominant limfocite cu funcţii supresoare (*T*s).

Iniţial, semnalele transmise de către antigen activează funcţiile efectorii ale limfocitelor. Urmează un complex de reacţii care, fie că măresc, fie că suprimă răspunsul imun şi care sunt sub controlul unor circuite imunoreglatorii complexe. Se pare că declanşarea funcţională de către antigen a celulei *T*h este însoţită în mod automat şi de emiterea de semnale de către celule cu funcţii supresoare sau contrasupresoare. Interacţiunea dintre *T*s şi ţinta sa este sub control genetic, exact cum sunt interacţiunile acestei ţinte cu celulele *T*c. Cu alte cuvinte, celulele *T*s care deprimă funcţia unei singure clone de limfocite, cu receptori de membrană pentru un anumit epitop, exprimă aceleaşi antigene MHC de clasa I sau II şi aceleaşi specificităţi idiotipice ca şi limfocitele *T*h a căror generare sau funcţie o inhibă. În afară de limfocitele *T*s cu specificitate pentru o singură clonă de celule *T*h, ar exista şi limfocite *T*s nespecifice, care pot inhiba mai multe clone de celule

*T*. Proliferarea acestor limfocite *Ts* nespecifice ar fi consecinţa unor activări policlonale induse de activatori de genul ConA. La rândul lor, sunt sub controlul celor *Tcs*, interacţiunea dintre aceste două subtipuri celulare ducând la inactivarea funcţională a celor *Ts*.

Trebuie totuşi subliniat faptul că existenţa celulelor supresoare, specifice sau nespecifice, este încă discutabilă la om, iar proliferarea de clone *Ts* este problematică. Este posibil ca limfocitele *Ts* să se supună aceloraşi reguli de recunoaştere, cooperare şi control ca şi celulele ajutătoare sau efectoare ale imunităţii, fapt care ridică problema dacă nu cumva ele nu există decât ca forme funcţionale aflate într-o anumită etapă evolutivă sau condiţionate de o situaţie existentă la un moment dat în relaţia organism-agresor: în faza de debut a răspunsului imun aceeaşi celulă acţionează ca şi celulă amplificatoare sau chiar efectoare, pentru ca, la sfârşitul lui, să devină supresoare. În fond ar fi o acţiune similară unui sistem termostat în care aceeaşi piesă, condiţionată de nivelul temperaturii existent la un moment dat, deschide sau închide circuitul electric, comportându-se deci ca "activator" sau "supresor" al procesului fizic respectiv. Bineînţeles, există posibilitatea funcţionării a două piese diferite: una care să activeze "încălzirea" şi alta care s-o "blocheze". Aceeaşi situaţie ar putea fi şi în organism, în sensul că ar putea exista limfocite *Th* şi *Ts* ca populaţii distincte nu numai sub raport funcţional.

Există şi o altă posibilitate: supresia să fie consecinţa activării unor celule citotoxice autoreactive care, la un moment dat, să "ucidă" celulele efectoare care "şi-au făcut datoria", inhibând astfel reacţiile imune prin "deleţie" celulară. Acest concept ar explica oarecum de ce atât limfocitele *Tc* cât şi cele *Ts* sunt $CD8^+$ (deşi limfocitele *Ts* au receptorul E termorezistent), în sensul că şi unele şi altele nu sunt altceva decât celule *Tc* care "văd" ţinte străine sau "ţinte proprii" respectiv limfocitele efectoare *T* sau *B*. Existenţa de clone de limfocite *T* citotoxice autoreactive a fost demonstrată experimental, fapt care validează ipoteza că nu există celule *Ts* ci funcţii supresoare exercitate de populaţii citotoxice care ucid efectoarele, deci un fel de supresie indusă prin eliminarea celulelor active. Procesul este similar celui descris la reţeaua idiotipică: limfocitele *T* care răspund sistemului şi ucid ţinta ar fi similare anticorpilor $A_1$, iar *T* s (sau citotoxice pentru $A_1$) ar corespunde celor $A_2$, care ar recunoaşte prin receptorul pentru antigen complexul idiotip-MHC de pe $A_1$, fiind în fond celule *T* autoreactive anti-idiotip.

În afară de limfocitele *T*, un rol important în reglarea răspunsului imun revine şi macrofagelor. Acestea, după cum s-a menţionat anterior, prelucrează şi dozează antigenul concentrându-l sau reţinându-l pentru a menţine intensitatea stimulului la nivel constant, eliberează monokine cu rol de semnale auxiliare activatoare cum este cazul IL-1, sau inhibitoare (PGE2, LTB4) şi cooperează prin contact direct cu alte limfocite. *In vitro* s-a constatat că limfocitele *T* nu pot răspunde la antigene sau mitogene decât în prezenţa macrofagelor, activarea limfocitelor *T* de către antigen depinzând de raportul limfocit *T* /macrofag: când raportul este mai mare de 5, are loc activarea celulelor *T*, iar când acest raport este în jurul valorii de 1, nu mai are loc activarea, fapt care sugerează şi existenţa unor funcţii supresoare ale macrofagelor (când sunt multe inhibă activarea celulelor *T*), probabil datorate secreţiei în cantităţi mari de $PGE_2$ şi alte monokine.

## REGLAREA NEUROENDOCRINĂ

Sistemul imun are numeroase conexiuni cu sistemul neuroendocrin, fiind în mare măsură influenţat de către acesta, în special prin intermediul timusului care primeşte semnale atât de la hipotalamus cât şi de la glanda pituitară anterioară. De altfel, atât organele limfoide primare cât şi cele secundare au numeroase filete

nervoase, nor-adrenergice, adrenergice sau colinergice, dintre care unele sunt în contact direct cu limfocitele *T*.

Limfocitele au receptori pentru numeroşi hormoni (tabelul 101), fiecare hormon influenţând mai mult sau mai puţin caracteristic răspunsul imun (tabelul 102).

În cazuri de stres, sau în cursul unor administrări terapeutice deliberate, creşterea nivelului corticosteroizilor de exemplu, sau a endorfinelor ori met-encefalinei induce o depresie reversibilă a răspunsului imun. Aceste efecte supresoare sunt contracarate de către hormonul pineal şi de către melatonină.

În afară de catecolamine şi corticosteroizi secretaţi de către corticosuprarenale, precum şi de hormonii de creştere secretaţi de pituitara anterioară, ţesutul limfoid mai poate fi influenţat de hormoni de sex, de tiroxină sau de semnale nervoase venite de la hipotalamus. La rândul lor, celulele limfoide influenţează hipotalamusul, pituitara anterioară şi alte compartimente neuroendocrine prin interleukine şi în special prin IL-1, ACTH, prin factori supresori ai histaminei (HSF) produşi de către limfocitele *T* etc. Unele dintre acestea, ca de pildă IL-1 sau interferonii, au efecte analgezice asupra sistemului nervos, fiind considerate ca "neuropeptide morfinice".

*Tabelul 101*

**Receptori pentru neuromediatori şi neurohormoni la nivelul celulelor sistemului imun**

| Celula | Receptori pentru |
|---|---|
| *T* | Somatostatină<br>Peptida vasointestinală (VIP)<br>Substanţa P (SP)<br>Leu-encefalina<br>Met-encefalina<br>$\beta$ -endorfina<br>Corticotropina |
| *B* | Substanţa *P (SP)*<br>Peptida vasointestinală *(VIP)*<br>Corticotropina |
| Monocite | Substanţa *P (SP)*<br>Encefaline<br>Endorfine |
| Granulocite | Substanţa *P (SP)*<br>Somatostatina<br>Endorfine |
| Celule *NK* | $\gamma$ -endorfine<br>$\beta$ -endorfine<br>Metencefaline |

*Tabelul 102*

**Efectele unor neuromediatori şi neuropeptide asupra celulelor sistemului imun**

| Neuromediatorul | Efectul |
|---|---|
| Noradrenalina | - Inhibă proliferarea limfocitelor<br>- Reduce activitatea limfocitelor *Tc*<br>- Activează sinteza anticorpilor |
| Beta-endorfine | - Activează proliferarea limfocitelor<br>- Activează activitatea *NK*<br>- Suprimă sinteza anticorpilor<br>- Activează producerea de IFN-$\gamma$<br>- Inhibă migrarea leucocitelor |
| Substanţa *P* | - Activează proliferarea limfocitelor *T*<br>- Stimulează activitatea fagocitară a granulocitelor şi macrofagelor<br>- Induce degranularea mastocitelor<br>- Măreşte chemotactismul leucocitelor |
| *VP* (Pepsina vaso-intestinală) | - Inhibă proliferarea limfocitelor *T*<br>- Inhibă migrarea leucocitelor<br>- Inhibă producerea de IL-2<br>- Inhibă activitatea *NK* |

## ALTE MECANISME DE REGLARE

Durata de viaţă a celulelor efectoare sau deleţia unor populaţii celulare reprezintă mijloace eficace de reglare, uneori reversibile, alteori ireversibile. De exemplu, durata de viaţă relativ scurtă a celulelor efectoare face ca acestea să-şi înceteze activitatea, întregul proces reacţional stingându-se relativ repede după eliminarea antigenului. De asemenea, absenţa unor clone celulare, moştenită congenital sau indusă accidental, modifică profund potenţialul reactiv imun. Este cunoscut cazul unor tulpini consangvine de cobai care nu pot răspunde la stimuli cu anumite antigene din cauză că nu au clonele de limfocite *Th*, care activează clonele de celule *B* cu receptori pentru antigenul respectiv.

Controlul răspunsului imun este un proces biologic obligatoriu şi complex care interesează nu numai efectoarele imunităţii, ci şi alte sisteme şi organe, începând cu centrul termoreglator şi terminând cu sistemul neuroendocrin. De fapt, nu se poate face o distincţie netă între mecanismele care stau la baza generării şi desfăşurării reacţiilor imune şi cele care reglează şi controlează aceste reacţii, deoarece ele sunt simultane şi se condiţionează reciproc. Aceasta este încă o dovadă a unităţii funcţionale şi structurale a organismului care în mod cert este un tot unitar indivizibil.

# EVOLUŢIA SISTEMULUI IMUN* ŞI A FUNCŢIILOR SALE

Sistemul imun al mamiferelor este rezultatul unor îndelungate procese selective şi de adaptare ale organismului, care au avut şi au loc atât la nivel de specie cât şi la nivelul fiecărui individ. De-a lungul procesului evolutiv, presorii selectivi din mediu au eliminat organismele slab dezvoltate sau inadaptabile, supravieţuind numai cele care au fost capabile să anuleze influenţele negative.

Deci, în cursul evoluţiei filogenetice, au supravieţuit numai acei subiecţi care s-au adaptat la condiţiile de mediu şi care au generat noi specii, înzestrate cu funcţii şi organe mult mai eficiente. Dintre aceste funcţii şi organe, un loc important revine sistemului imun. Dacă evoluţia filogenetică se referă la îndelungatul proces de formare a speciei, cea ontogenică defineşte secvenţa evenimentelor care controlează formarea individului din momentul concepţiei până la maturarea lui fiziologică. Ca şi specia, individul este mai mult sau mai puţin expus acţiunii modificatoare a factorilor de mediu cu care trebuie să găsească un *modus vivendi* convenabil. În cazul unei inadaptări el va dispărea, supravieţuind numai acei subiecţi care s-au acomodat rapid şi care vor continua procesul evolutiv şi perpetuarea speciei.

Cunoaşterea gradului de dezvoltare a sistemului şi funcţiilor imune, la nivelul diferitelor etape ale evoluţiei filogenetice sau ontogenetice, are o importanţă teoretică şi practică majoră deoarece, pe de o parte, ajută la o mai bună înţelegere a proceselor şi mecanismelor de apărare imună, iar pe de altă parte, contribuie la optimizarea posibilităţilor de controlare a lor.

## FILOGENIA IMUNOCOMPETENŢEI

Imunitatea "nespecifică" a vertebratelor poate fi bine înţeleasă numai prin cunoaşterea corectă a apărării nevertebratelor, indiferent dacă acestea sunt organisme formate dintr-o singură celulă sau dintr-o colonie de celule, fără cavitate corporală ("acoelomate") sau cu cavităţi corporale ("coelomate"), din care au derivat artropodele şi vertebratele, cu enorma lor diversitate de specii.

Trebuie menţionat faptul că studiul imunităţii la nevertebrate, deşi îşi are începuturile încă din secolul XIX, este încă puţin dezvoltat. Cu toate că începuturile cunoştinţelor noastre privitoare la apărarea prin fagocitoză îşi au originea în studiile făcute de către MECINICOFF pe nevertebrate, totuşi, aprofundarea lor la nevertebrate nu a înregistrat progrese remarcabile. Încă nu se cunosc multe din mecanismele care stau la baza apărării celenteratelor, acoelomatelor, moluştelor

sau artropodelor. Se ştie doar că această apărare există, că este extrem de eficientă, dar nu se ştie în amănunt care sunt efectorii ei moleculari şi cum acţionează aceşti efectori.

Este considerat imunocompetent organismul care are capacitatea de a deosebi structurile proprii de cele străine, deci care este capabil să recunoască şi să reacţioneze specific la diferite antigene. Acest răspuns implică sinteza de imunoglobuline, rejecţia homogrefelor, proliferarea clonelor de celule imunocompetente după contactul cu antigenul, dezvoltarea reacţiilor de hipersensibilitate şi instalarea memoriei imunologice, exprimată prin sinteză activă de anticorpi după stimulul antigenic secundar, sau prin réjecţia accelerată a grefei secunde. Toate acestea sunt atribute funcţionale ale organismelor superioare, respectiv ale verte-bratelor superioare (păsări, mamifere) dotate cu un sistem specializat de apărare. Dar, pe plan evolutiv, păsările şi în special mamiferele ocupă treptele de sus ale scării evolutive.

Cercetările din ultimele 2 - 3 decenii privind aspectele evolutive ale imunologiei pledează tot mai mult în favoarea existenţei unor mecanisme de apărare, la nevertebrate pe de o parte, şi a unui sistem imun cu caractere comune tuturor vertebratelor pe de altă parte, în sensul că toate acestea posedă limfocite, sintetizează imunoglobuline şi rejectează alogrefele (tabelul 103). Dezvoltarea pe scară filogenetică a ţesutului limfoid este asociată cu capacitatea de a reacţiona mai rapid şi specific la un spectru tot mai larg de antigene, iar studiile asupra structurii imunoglobulinelor prezente la speciile aflate pe diferite trepte de evoluţie sunt de un real interes pentru înţelegerea multor mecanisme care guvernează sinteza acestui tip de proteine.

*Tabelul 103*

**Dezvoltarea sistemului imun în cursul evoluţiei filogenetice**

| Trepte de evoluţie | | Organe, celule sau funcţii imune prezente |
|---|---|---|
| Clasă | Ordin | |
| Nevertebrate | | Rudimente de celule fagocitare<br>Reacţii primitive de tip anafilactic<br>Aglutinine primitive (?) |
| *Cyclostomata* | *Myxinoides* (peştii viermiformi) | Prezenţa unui rudiment de splină eritropoietică<br>Celule asemănătoare limfocitelor |
| | *Petromyzontia* (peşti primitivi, ţipar) | Timus primitiv<br>Splină limfopoietică<br>Limfocite prezente în circulaţie<br>Răspuns imun adaptativ rudimentar:<br>- rejecţie de ţesuturi<br>- sinteză de anticorpi<br>- memorie imunologică |

| Trepte de evoluţie | | Organe, celule sau funcţii imune prezente |
|---|---|---|
| Clasă | Ordin | |
| Elasmobranchii | Selacieni (rechinii) | Timus dezvoltat (zonă medulară şi corticală)<br>Splină cu focare limfoide<br>Focare limfoide la nivelul gonadelor şi intestinului<br>Limfocite circulante, lipsa plasmocitelor<br>IgM primitiv |
| | *Batoidea* (rechinii plaţi) | Timus dezvoltat, involuează cu vârsta<br>Splină bine organizată (pulpă albă şi roşie)<br>Ţesut limfoid abundent<br>Apar plasmocitele |
| *Actinopterygii* | Sturionii cartilaginoşi | Timus definitiv organizat (cu lobi, lobuli)<br>Splina bine organizată (pulpă albă, roşie)<br>Existenţa limfocitelor în toate stadiile de dezvoltare, inclusiv plasmocite<br>Ţesut hematopoietic pericardic, similar măduvei osoase<br>Sinteza a două clase de imunoglobuline cu constanta de sedimentare 7S şi 19S<br>Răspuns primar şi secundar viguros |
| *Tetrapoda* | Amfibii<br>Reptile | Apar nodulii limfatici primitivi, cu foliculi limfoizi încapsulaţi<br>Amigdale primitive<br>Celule plasmatice în "lamina propria" a intestinului (apărare locală, precursori IgA) |
| *Aves* (păsări) | | Existenţa mecanismului de apărare imună dublu: umoral şi celular<br>Prezenţa limfocitelor T şi B<br>Clase bine precizate de imunoglobuline IgM şi IgG, cu subclase IgG<br>Absenţa anticorpilor IgA şi IgE |
| *Mammalia* (mamifere) | | Sistemul imun şi funcţiile imune sunt complet şi complex dezvoltate |

## IMUNITATEA LA NEVERTEBRATE

Nevertebratele sunt forme primitive de viaţă care au evoluat din organismele unicelulare pe două mari direcţii principale: o direcţie care are ca punct culminant apariţia insectelor şi moluştelor, şi alta din care s-au desprins vertebratele, care pe plan evolutiv au culminat cu mamiferele (fig. 194).

În afară de vertebre, nevertebratelor le lipsesc şi organele limfoide cu forma de organizare cunoscută la vertebrate. De asemenea, nu este încă bine precizată existenţa la acest nivel a unor celule cu funcţii imune similare celor de la vertebrate.

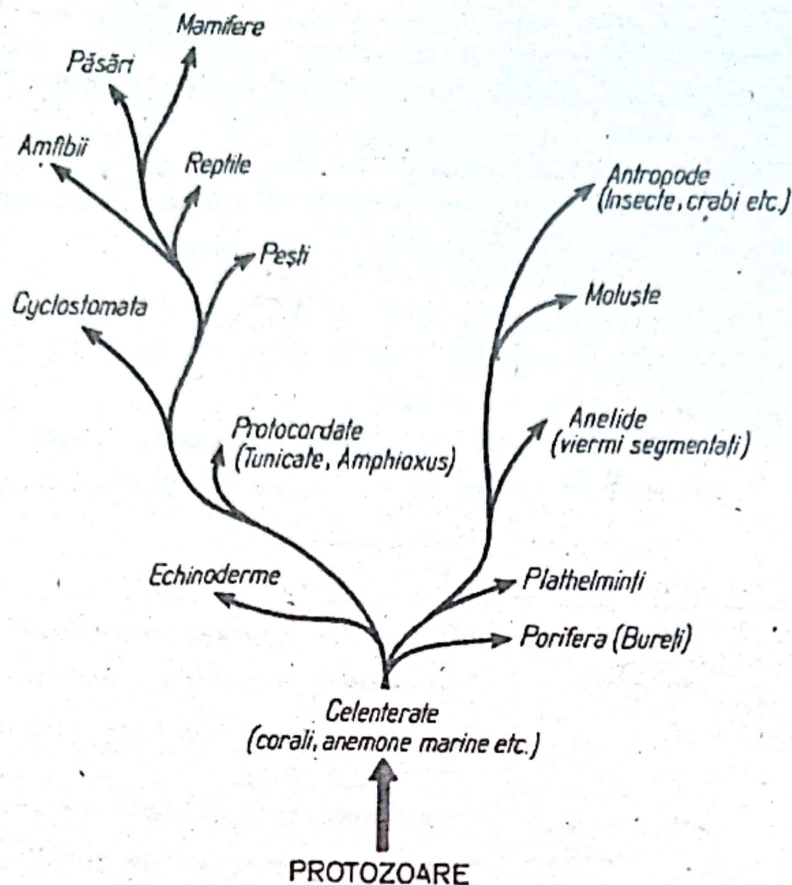



Fig.194. Evoluţia regnului animal de la fiinţe unicelulare până la mamifere.

Se pare că organismele multicelulare primitive au celule de apărare capabile să recunoască şi să răspundă la semnalele primite din partea propriilor ţesuturi afectate. Ar fi o dublă funcţie, de "apărare" şi de "reparare" tisulară care în fond menţine homeostazia. În acest scop, aceste celule au capacitate adezivă, probabil fiind înzestrate cu forme arhaice de molecule de adeziune şi posibilităţi de deplasare, adică, "capacităţi locomotorii" puse în mişcare de factori solubili care fac posibilă recunoaşterea leziunii şi repararea ei prin celule de apărare.

Celenteratul marin *Anthopleura elegantissima* este capabil de recunoaştere alogenică rapidă, iar *Botrylos,* o colonie de tunicate, manifestă existenţa unor locus-uri de histocompatibilitate care dezvoltă "specificităţi de colonie". Membrii unei colonii sunt expulzaţi de membrii altor colonii. S-a postulat că atât la tunicate cât şi la sperma umană se face recunoaşterea şi penetrarea celulelor proprii speciei prin intermediul unor molecule de suprafaţă de genul celor MHC. În hemolimfa insectelor există lizozim bacteriolitic, peptide bactericide, proteine bacteriostatice, factori inductibili proteici, cu greutate moleculară mare (600 - 700 kD) care mimează activitatea imunologică a moleculelor de anticorpi, inclusiv existenţa unui rudiment de memorie imunologică.

Se ştie însă că nevertebratele nu reacţionează la stimulii antigenici prin sinteză de anticorpi de natura celor existenţi la mamifere şi că nu au memorie imunologică. Pe baza acestor criterii, s-ar putea afirma că aceste vieţuitoare nu posedă capacitatea de a dezvolta răspuns imun. Totuşi, ele au celule care recunosc "non-propriul" fagocitându-l, funcţie de apărare esenţială la acest nivel evolutiv, care se menţine în continuare pe toată scara evolutivă, fără a-şi pierde din importanţă. Faptul, că la mamifere antigenul odată pătruns în organism declanşează ca primă reacţie de apărare funcţia fagocitară, poate reprezenta o "amintire"

rămasă din timpuri imemoriale, când fagocitoza era unica formă de apărare imună. Dar, la unele specii de nevertebrate este semnalată, după cum spuneam, şi existenţa altor reacţii imune. Astfel, la râmă, în 50% din grefele de tegument se înregistrează rejecţie în decurs de 18 - 20 de zile în cazul în care tegumentul grefat provine de la aceeaşi familie. Procentul reacţiilor de eliminare creşte dacă grefa se face între indivizi care aparţin unor grupe mai îndepărtate. Mai mult, eliminarea grefei este adesea însoţită de o infiltraţie la locul rejecţiei cu celule asemănătoare limfocitelor.

Nevertebratele reacţionează la non-propriu mai ales mediat celular, începând cu fagocitoza primitivă de la amoebe şi culminând cu existenţa unor populaţii de celule de la coelomate, poate impropriu denumite "imunocite". La echinoderme, moluşte şi artropode a putut fi identificată chiar existenţa de imunocite cu caractere diferite, un gen de "subclase" cu densitate diferită, cu conţinut diferit de granule citoplasmatice bogate în enzime şi cu potenţial de legare a unor lectine. Aceste imunocite ar fi capabile de agregare, locomoţie şi fagocitoză. Totuşi, trebuie multă prudenţă în considerarea rejecţiilor de grefă şi caracterelor diferite ale "imunocitelor" ca fenomene biologice asemănătoare, analoage celor existente la mamifere (tabelul 104).

*Tabelul 104*

**Unele caracteristici generale ale imunocitelor de la nevertebrate şi ale limfocitelor mamiferelor**

| Caracterul considerat | Prezenţa caracterului | |
|---|---|---|
| | Mamifere | Nevertebrate |
| Originea mezemchimală a celulelor imune | + | - |
| Existenţa de organe ca sediu al celulelor limfoide (timus, splină etc.) | + | - |
| Prezenţa funcţiilor mediate celular (T) | + | - (?) |
| Existenţa funcţiilor mediate umoral | + | - (?) |
| Cooperări celulare în reacţiile imune | + | - |
| Morfologie celulară nediferenţiată (a limfocitelor sau celulelor similare) | + | + |
| Citoplasmă agranulară | + | - (?) |
| Prezenţa markerilor de membrană | + | - (?) |
| Prezenţa receptorilor pentru antigene | + | - |

Datele se referă la limfocitele de şoarece considerate ca prototip al celulelor de mamifere, deoarece au fost cele mai bine studiate.

Tot la râmă, la rac etc. ar exista şi unele forme primitive de reacţii anafilactice. La diverse specii de nevertebrate a fost descrisă existenţa unui răspuns protector specific faţă da antigenele bacteriene şi a unor heteroaglutinine capabile să se combine cu structuri de pe suprafaţa eritrocitelor mamiferelor. Studiile electroforetice ale lichidului celomic sau vascular nu au pus în evidenţă existenţa unor proteine care migrează în regiunea gammaglobulinelor. Totuşi, se pune întrebarea dacă acest criteriu este absolut obligatoriu? Pe baza caracterelor fizico-chimice ale unor molecule de hemaglutinine cu greutatea 390 kD şi

constanta de sedimentare de 13,5 S, care migrează în regiunea beta, au fost identificate cca. 18 subunităţi care în unele porţiuni ale moleculei aveau aceeaşi structură primară. Datele ar sugera că aceste lanţuri ar fi strămoşii lanţurilor de imunoglobulină cu secvenţe constante şi variabile. Mai mult, dintre aceste subunităţi, una are aceeaşi mărime ca şi lanţul *L* de la mamifere.

Aglutininele naturale, deşi au o oarecare specificitate la vertebrate nu cresc ca titru după stimulul cu hematii, iar substanţele umorale au un spectru funcţional limitat şi o cinetică diferită de cea existentă la nevertebrate. După "imunizare" protecţia apare foarte rapid, dar şi durează un timp extrem de scurt (doar câteva zile). Nu este exclus ca aceste aglutinine să reprezinte forme primitive de imunoglobuline. De asemenea, nu este exclus ca la aceste vieţuitoare să joace un rol important în apărare şi liza dependentă de complement.

La echinoderme ar exista celule fagocitare care ar avea receptori pentru molecule similare componentelor *C* 3b ale complementului, şi un sistem litic umoral cu caracteristici proprii celui generat de complement la mamifere. Hemolimfa insectelor reacţionează cu veninul de cobră producând o convertază *C* 3, care clivează componenta *C* 3a generând *C* 3b. Mai mult, a fost semnalată existenţa unor factori umorali similari citokinelor, sintetizaţi de către imunocitele nevertebratelor şi potenţi funcţional *in vitro* faţă de limfocitele mamiferelor. Semnificaţia acestor constatări este încă obscură. Dar, se poate afirma că la nevertebrate există un tip rudimentar de apărare pe care l-am putea denumi "pseudoimun" şi care se manifestă prin îndepărtarea non-propriului atât mediat celular prin intermediul celulelor fagocitare, cât şi printr-un rudiment de reacţii mediate umoral (aglutinine nespecifice), care însă nu sunt analoage celor de la vertebrate. Principala lor formă de apărare rămâne totuşi cea fagocitară. Rămâne de văzut dacă restul mijloacelor de apărare prezente la unele specii (hemaglutinine, lizine etc.) sunt artefacte sau simple excepţii de la regula generală.

## IMUNITATEA LA VERTEBRATE

Schematic, evoluţia vertebratelor este următoarea: o încrengătură *(Craniota)* cu două subîncrengături *(Agnatha şi Gnatosthomata)*.

Subîncrengătura *Agnatha* include ordinele *Mixinoide* şi *Petromyzontia*, vertebrate fără maxilare, cu corp vermiform şi scheletul redus la o coadă dorsală (fig. 195). Vertebrele lipsesc complet.

Subîncrengătura *Gnatosthomata* cuprinde vertebratele cu maxilare, şi anume supraclasa *Pisces* cu clasele *Chondrichtes* şi *Osteichtes*, derivate dintr-o clasă dispărută *(Placodermes)*. Clasa *Chondrichtes* cu subclasa *Elasmobranchii* şi ordinele *Selacieni* şi *Batoidea* îşi menţin structura cartilaginoasă a scheletului. Clasa *Osteichtes*, din care fac parte peştii osoşi, a evoluat spre două direcţii principale: una, care a mers spre direcţia subclasei *Teleosteeni*, din care fac parte cca. 11 500 de specii din totalul de 12 000 de specii existente astăzi, cuprinde clasa *Actinopterygii*, ordinul *Chondrosteeni*. din care fac parte peştii osoşi, cu scheletul complet osificat dar cu craniul cartilaginos, subclasa *Holosteeni*, formă de tranziţie spre subclasa *Teleosteeni* cu scheletul complet osificat. Altă ramură are la bază clasa *Choanichtyes* ai căror reprezentanţi au o formă superioară de organizare, şi anume un gen de orificii nazale interne (choane). Din aceştia descind patrupedele inferioare şi superioare, respectiv *amfibiile*, *reptilele*, *păsările*

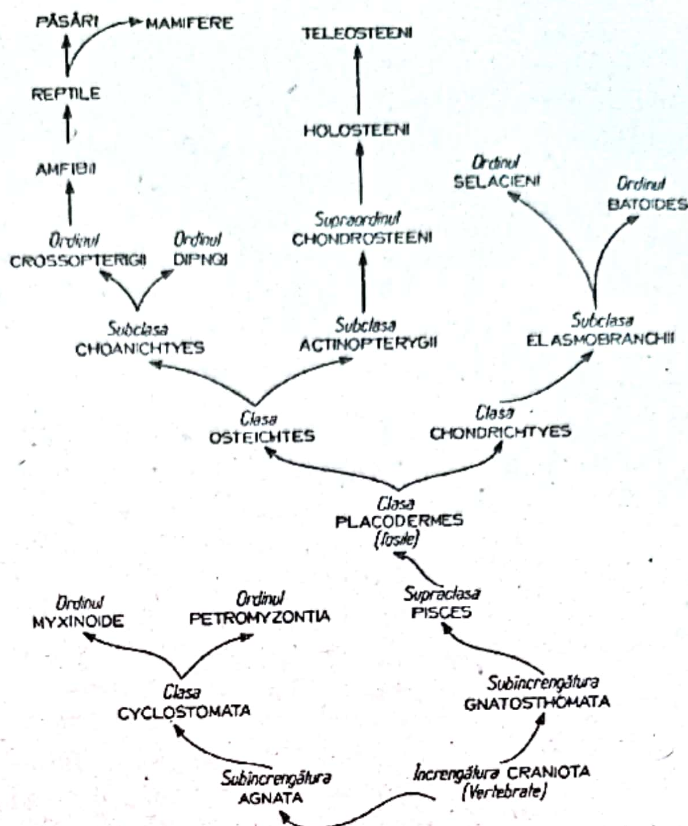



Fig.195. Direcţii în evoluţia filogenetică a vertebratelor.

*şi mamiferele.* La unele, cum ar fi o parte din reptile, membreleexistă ca rudimente, iar la altele, cum ar fi păsările, membrele anterioare sunt transformate în aripi.

Paralel cu evoluţia vertebratelor, se dezvoltă şi sistemul lor imun. Cele mai primitive dintre acestea, *Cyclostomii,* ar avea o splină eritropoietică rudimentară şi celule similare limfocitelor, prezente în circulaţie şi participante la reacţiile inflamatorii. *Myxinoidele,* aflate în condiţii de viaţă obişnuite (temperaturi în jur de $+10^0$C), nu rejectează homogrefele. La temperaturi mai ridicate, sunt capabile de rejecţie şi de sinteză de anticorpi.

*Petromyzontia* au celule limfoide în epiteliul faringian, considerate ca un rudiment de timus primitiv, splină limfopoietică, limfocite mici, mijlocii şi mari (aflate în diverse stadii de maturare), dar nu au plasmocite. Aceste vieţuitoare pot dezvolta reacţii imune faţă de diverşi stimuli antigenici, exprimate prin rejecţii de grefă, reacţii alergice de tip întârziat, memorie imunologică. Sunt considerate ca cele mai primitive vertebrate la care s-a putut identifica existenţa unui răspuns imun adaptativ.

*Elasmobranhiile inferioare* (Selacieni sau rechinii inferiori) au un sistem limfoid mai dezvoltat, alcătuit din timus organizat (medulară şi corticală) care nu involuează cu vârsta, precum şi din splină, focare limfoide prezente la nivelul intestinului, gonadelor şi parenchimului renal. Au limfocite circulante, dar nu au plasmocite.

*Elasmobranhiile superioare* (*Batoidea* sau rechinii plaţi), au splina alcătuită din pulpa albă şi roşie, ţesutul limfoid este abundent, apar plasmocitele identice cu cele de la mamifere. Timusul involuează o dată cu vârsta.

*Heterodentus francisci* (rechinul cornos) este cea mai primitivă vertebrată la care sunt molecule de anticorpi formate din lanţuri legate între ele prin legături disulfidice. Lanţurile grele sunt codificate de unităţi transcripţionale *VDJC,* care la mamifere sunt asamblate din segmente genice separate. La rechin, mănunchiul

de gene *VDJC* a suferit o duplicare care a permis generarea diversităţii de gene $V_H$ codificate în linia germinativă. La aceste animale sunt câteva sute de gene pentru lanţul *H*, structura lor reflectând forma ancestrală atât pentru imuno-globuline, cât şi pentru receptorul pentru antigen de pe limfocitul *T* al mamiferelor.

La vertebratele din clasa *Osteichtes* (*Chondroteeni* sau sturioni, *Holosteeni* sau peştii ganoizi osoşi şi Teleosteeni sau peşti osoşi) timusul este definitiv organizat. Este alcătuit din lobi, lobuli, timocite şi involuează o dată cu vârsta. Splina are pulpa roşie şi colecţii dense de limfocite abundente, în care sunt prezente şi celulele plasmatice. Pericardul are un ţesut hematopoietic similar măduvei osoase de la mamifere şi, probabil, este locul de generare a celulelor suşă. Limfocitele sunt capabile de recunoaşterea şi migrarea în arii specifice, deci de ecotaxie, speciile aparţinând acestei clase putând dezvolta atât răspuns imun primar cât şi secundar faţă de numeroase antigene, dovadă că memoria imunologică la acest nivel de dezvoltare este perfectă.

*La amfibii şi reptile* încep să apară ganglioni limfatici primitivi, formaţi din foliculi limfatici încapsulaţi, acumulări de limfocite mici şi mijlocii în regiunea sublinguală, un fel de amigdale primitive, precum şi celule plasmatice în "lamina propria" a intestinului, precursori ai limfocitelor care vor deveni secretoare de IgA la speciile mai evoluate.

*Păsările* au un sistem imun dublu celular, derivat din timus şi din bursa lui Fabricius. Este prima dată când apar aceste două organe limfoide centrale, care vor instrui populaţiile de celule *T* şi *B* înzestrate cu funcţii imune distincte. Pot sintetiza anticorpi din clasele IgM, IgG, în mai slabă măsură din clasa IgA, dar nu şi din clasa IgE, reacţiile anafilactice lipsind la acest nivel evolutiv. Se ştie că celulele timice sunt relativ mai independente în exercitarea funcţiilor lor imune, ele ajutând, dar fiind mai puţin ajutate de către celulele *B*. Această independenţă funcţională ar putea fi o expresie a priorităţii lor pe plan evolutiv. Precursorii timusului apar primii în filogenie, încă de la nivelul ordinului *Petromyzontia,* pe când cei ai bursei lui Fabricius, proabil la *Elasmobranhii,* unde glandele rectale sau eventual sacul anal de la amfibii ar putea fi strămoşii acestui organ. Această speculaţie de ordin teoretic pare a fi susţinută şi de faptul că timectomia în stadiul larvar la amfibii inhibă sinteza anticorpilor din clasele IgM şi IgG, în timp ce la mamifere, sinteza IgM consecutiv timectomiei se menţine la valoare aproape normală. Dacă cele două clase de imunoglobuline de la amfibii sunt distincte,atunci influenţa timectomiei asupra sintezei IgM la aceste vieţuitoare s-ar explica prin aceea că timusul are un rol important în controlul producţiei de anticorpi la această treaptă de evoluţie filogenetică sau, altfel spus, acum ar apărea strămoşii limfocitelor *T* supresoare.

Ca şi timusul la vertebratele inferioare, bursa persistă toată viaţa la păsările primitive, dar involuează o dată cu vârsta la speciile mai evoluate. În afară de organele limfoide primare, păsările şi mamiferele au un sistem limfoid secundar (splină, ganglioni limfatici etc.) la nivelul căruia diferenţierea celulară este influenţată de prezenţa antigenului.

Deoarece în cercetarea imunologică structura şi funcţiile imunoglobulinelor au fost investigate prioritar, este firesc ca şi apariţia lor pe scară filogenetică să fie mai bine cunoscută. O formă primitivă de molecule similare imunoglobulinelor ar apărea la *Cyclostomi.* Dacă la nevertebrate nu se poate vorbi de existenţa unor structuri moleculare similare anticorpilor, ci doar de subunităţi proteice asemănătoare lanţului *L,* la peştii primitivi stimulul antigenic induce formarea de anticorpi cu o migrare electrofetică eterogenă, în regiunile $\alpha$, $\beta$ şi $\gamma$ şi cu diferite constante de sedimentare, de la 6,6 S până la 14 S. Se pare că formele 7 S şi 14 S sunt identice şi similare ca structură, reprezentând forme monomerice şi polimerice ale aceleiaşi clase de proteină, situaţie întâlnită de altfel şi la ver-

tebratele superioare. Molecula este formată din patru lanţuri polipeptidice, ceva similar cu două lanţuri *L* şi două *H*, cu legături necovalente *L-H* şi *H-H*, dar fără legături disulfidice între lanţurile *L* şi *H*. Greutatea moleculară a anticorpilor 7 S este 188 kD, deci foarte apropiată de cea a mamiferelor, din care, lanţul *H* are greutatea de cca. 70 kD, cu mobilitatea electroforetică a lanţului $\mu$ de la mamifere, iar lanţul *L* are greutatea de 24 kD. Aproape 30% din imunoglobuline sunt reprezentate de lanţul *L*, dintre care unele au extremitatea $NH_2$ terminală cu resturi de acid aspartic.

Spre deosebire de Cyclostomi, *Elasmobranhiile* posedă două tipuri de imunoglobuline; un tip 17 - 19 S care apare după stimulul antigenic primar şi se menţine în circulaţie mai multe luni, şi un tip 7 S, sintetizat după stimulul secundar. Dar, spre deosebire de păsări şi mamifere, anticorpii 19 S şi 7 S nu reprezintă clase separate de imunoglobulină ci mai degrabă proteine strâns înrudite aflate sub controlul unei gene unice. Ambele au un procent ridicat de hidraţi de carbon, iar lanţurile *H* şi *L* sunt distincte ca mărime, secvenţa în aminoacizi şi proprietăţi antigenice. Se pare că ar fi polimeri ai aceloraşi proteine, care diferă numai prin greutatea lor moleculară. Conţinutul ridicat de hidraţi de carbon al lanţului *H*, greutatea moleculară a acestui lanţ şi a întregii molecule, precum şi mobilitatea electroforetică a proteinei 17 - 19 S de la Elasmobranhii, sunt foarte asemănătoare cu IgM de la mamifere.Cu toate acestea, cele două proteine nu sunt identice. Astfel, numărul situsurilor combinative la proteina Elasmobranhiilor este mai mare decât cel existent pe molecula IgM.

Nu se ştie dacă aceste situsuri recunosc într-adevăr antigenul sau au alte semnificaţii. Ar putea fi doar un tip de proteină funcţională care nu s-a mai păstrat la formele de viaţă evoluate.

La *Osteichtes*, datele sunt insuficient cunoscute. După stimulul antigenic primar, răspund prin formarea de anticorpi 19 S care, după mai multe luni, sunt înlocuiţi cu 7 S. Proteina intactă 19 S, deci IgM, are greutatea moleculară 900 kD, lanţuri $\mu$ cu greutatea 70 kD şi lanţuri *L* cu greutatea de 20 - 23 kD. Molecula de proteină 7 S, similară clasei IgG, are greutatea 120 kD, iar lanţurile *H* şi *L* greutăţi de 40 kD, respectiv 20-22 kD. Din punct de vedere antigenic, determinanţii existenţi la nivelul anticorpilor 7 S sunt prezenţi şi la nivelul celor 19 S. Greutatea moleculară diferită a lanţurilor *H* aparţinând celor două tipuri de molecule, precum şi afinitatea lor diferită pentru antigene ar pleda pentru existenţa la peştii evoluaţi a două clase de imunoglobuline: una IgM şi alta IgG. Nu este însă exclus ca să fie vorba doar de simple diferenţe de afinitate a unor molecule diferite şi nu de o diferenţă reală a posibilităţilor de recunoaştere a antigenelor.

La peştii Teleosteeni se găsesc populaţii distincte de limfocite *B* şi *T* iar macrofagele funcţionează ca celule accesorii care secretă IL-1 similară dar nu identică funcţional şi chimic cu cea a mamiferelor.

La amfibii (broaşte, salamandre etc.), după stimulul antigenic primar apare o macroglobulină 19 S, care după 2-3 luni este înlocuită cu o moleculă 7 S. Caracterele antigenice şi structurale ale acestor molecule pledează pentru existenţa a două clase de imunoglobuline la acest nivel evolutiv.

Reptilele (broasca ţestoasă, şopârla, aligatorul etc.) au tot două clase de imunoglobuline (l9 S şi 7 S) care, spre deosebire de cele de la mamifere, nu-şi modifică în cursul imunizărilor aviditatea şi afinitatea pentru antigene. Probabil, că la reptile există un număr de clone celulare mai mic decât la mamifere, antigenele antrenând limfocite cu receptori care au aceeaşi capacitate de legare, fără posibilitatea recunoaşterii încrucişate a determinanţilor antigenici înrudiţi.

Păsările, după stimulul antigenic primar, sintetizează anticorpi IgM similari celor de la mamifere. La Galinaceae aceşti anticorpi au o durată de viaţă relativ scurtă, sunt sensibili la 2-mercaptoetanol şi migrează electroforetic în aceeaşi

regiune ca şi cei de la mamifere. De altfel, şi anticorpii IgG sunt similari cu cei ai mamiferelor: au aceeaşi greutate moleculară, constantă de sedimentare etc. În schimb, IgG de la păsări au o concentraţie de 2-3 ori mai mare de hidraţi de carbon şi sunt sensibili la acţiunea pepsinei. Nu se ştie dacă la găini sunt mai multe clase; ar exista o imunoglobulină care migrează în regiunea $\gamma 1$ şi care ar putea fi similară cu IgG1 de la mamifere. Imunoglobulinele la găină au o particularitate deosebită, şi anume aceea că precipită mai bine când reacţionează cu antigenul în medii cu un conţinut bogat de NaCl (1,5 *M* ), decât în ser fiziologic simplu. Se pare că la păsări, NaCl agregă molecule de IgG, pe suprafaţa agregatului apărând un număr mai mare de situsuri combinative, care fac să crească considerabil capacitatea de precipitare a antigenului. Totodată, coprecipită şi o componentă normală din ser, o macroglobulină lipoproteică, care este capabilă să lege complexe solubile adăugând precipitatului şi propria ei greutate. Spre deosebire de găină, la mamifere, concentraţiile mari de NaCl au un efect de disociere asupra legăturilor antigen-anticorp. La raţă, se cunosc trei clase distincte de imunoglobulină; o clasă 19 S similară clasei IgM de la mamifere, o clasă IgG cu constanta de sedimentare 7,8 S şi alta cu constanta 5,7 S. Aceste două clase sunt înrudite, dar nu sunt identice între ele; diferă la constantele de sedimentare, la migrarea electroforetică şi la comportamentul faţă de papaină.

La mamifere sunt 5 clase majore cu diverse subclase, imunoglobulinele IgG constituind clasa majoră. Dar chiar şi la acest nivel, există diferenţe între specii, condiţionate de gradul lor de evoluţie: unele specii au un număr mai mare de subclase IgG decât altele, clasa IgA este mai bine exprimată, pot exista chiar şi clase de anticorpi cu caractere particulare, cum este cazul la cal. Calul are componentul T, un anticorp cu constanta de sedimentare 10 S, care apare în ser după imunizări cu polizaharizi pneumococici sau alte antigene înrudite cu aceştia. Electroforetic migrează în regiunea betaglobulinelor, are un conţinut ridicat de hidraţi de carbon şi diferă antigenic de celelalte subclase de imunoglobuline. Iniţial s-a crezut că ar reprezenta clasa IgA, dar faptul că secvenţa aminoacizilor la nivelul regiunii constante a lanţului este omoloagă celei din clasa IgG a acreditat ideea că această componentă ar fi totuşi o subclasă de molecule IgG.

Date interesante au fost obţinute datorită studiilor secvenţelor aminoacizilor la nivelul lanţurilor *H* şi în special *L* în evoluţia filogenetică.

Există unii aminoacizi "cheie", cum ar fi cisteina, care asigură legăturile disulfidice interlanţ şi care sunt prezenţi aproape la toate speciile de vertebrate, indiferent de poziţia pe care o ocupă pe scara evolutivă. Totuşi, o dată cu evoluţia, secvenţa aminoacizilor (care la vertebratele inferioare este practic identică la lanţurile *H* şi *L*) începe să difere, lanţul *H* devenind mai lung, cu un număr de aminoacizi mult mai mare şi cu o structură antigenică diferită de la specie la specie şi de la clasă de imunoglobulină la clasă.

Structura lanţului *L* însă este mai puţin modificată, fiind oarecum similară la toate vertebratele, de la cele mai primitive până la cele mai evoluate. De exemplu, este un înalt grad de asemănare între lanţul *L* al peştilor şi cel $L\kappa$ al omului. Mai mult, lanţul $L\kappa$ este aproape identic cu $L\kappa$ de şoarece, dar diferit de $L\lambda$ de om. La toate mamiferele există lanţurile $L\kappa$ şi $L\lambda$, excepţie de la această regulă făcând doar calul şi nurca. Raportul $L\kappa/L\lambda$ variază de la specie la specie, fie în favoarea $L\kappa$, cum este cazul la şoarece sau om, fie în favoarea $L\lambda$, speciile strâns înrudite având raportul identic sau foarte apropiat. Toate acestea ar sugera că genele care controlează sinteza lanţurilor derivă dintr-un strămoş comun. Iniţial, o genă primitivă ar fi codificat sinteza unui lanţ peptidic de cca. 106 aminoacizi, egal în lungime cu jumătate din lanţul *L*, deci cu o greutate moleculară de 11-12 kD (fig. 196).

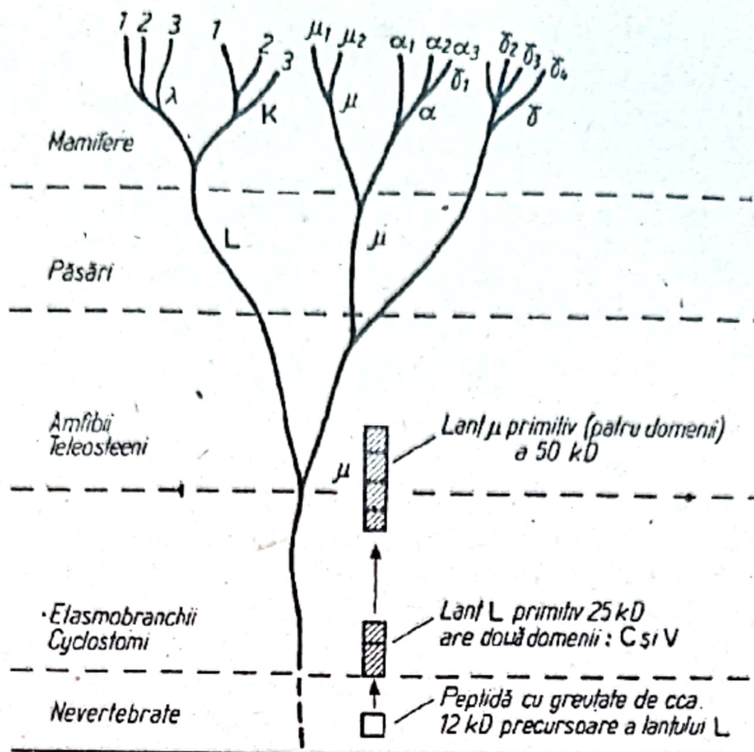



Fig.196. Trepte în evoluția filogenetică a lanțurilor ușoare (L) și grele (H) ale moleculei de imunoglobulină. Lanțurile actuale existente la diferitele specii de mamifere derivă dintr-un precursor comun primitiv, o peptidă cu greutatea moleculară mică existentă la nevertebrate.

Molecula de imunoglobulină la vertebratele primitive este formată din lanțurile $\mu$ și $L$, de unde ipoteza că această jumătate de lanț primitivă ar avea o origine mult mai veche, cu mult înaintea apariției vertebratelor. Este posibil ca în urma duplicării genei primitive să fi rezultat o genă care controla sinteza unui lanț polipeptidic dublu, adică a actualului lanț $L$ complet, din care au derivat genele care controlează lanțul $\mu$ primitiv de la Cyclostomi și Elasmobranhii. La Teleosteeni și amfibii, survine o nouă duplicare a genei $\mu$ în urma căreia este controlată sinteza unui nou tip de lanț similar lanțului gamma de la mamifere. În sfârșit, o duplicare târzie detașează genele sub controlul cărora se află lanțul $\alpha$ al mamiferelor.

Desigur, această prezentare este schematică și nu abordează multe probleme majore, cum ar fi de pildă codificarea markerilor alotipici IgG, care apar ca două locus-uri genetice cu alele multiple la fiecare locus și care segregă independent apariția genelor *V* și *C*, care codifică pentru regiunile constante, respectiv variabile, ale lanțurilor etc.

În fond, toate vertebratele derivă din arhaicele "cordate" cu un rudiment cartilaginos al coloanei vertebrale, așa că modalitățile de bază ale apărării umorale și celulare s-au păstrat pe tot parcursul procesului evolutiv, bineînțeles cu acumulări de noi specializări care au culminat cu perfecționarea moleculelor de imunoglobulină, limfokinelor, monokinelor, cu antigenele MHC și cu limfocitele *T* și *B* înzestrate cu un arsenal sofisticat de recunoaștere și de reacție specifică.

O dată cu procesul evolutiv, s-au dezvoltat mecanismele de apărare prin mediatori nespecifici, ca de pildă componentele complementului, leukotrienele, interleukinele, organele limfoide primare și secundare și, bineînțeles, efectorii celulari ai imunității, respectiv limfocitele *B*, limfocitele *T* și celulele *NK*.

Preocupări intense au fost depuse pentru descifrarea mecanismelor de citotoxicitate mediată celular. După unii, ar exista mai multe linii celulare cu diverse potențiale de recepționare a informațiilor și care ar fi modulate de natura stimulului

primit: sub restricţie MHC sau în afara acestei restricţii. Aşa s-ar explica de ce o celulă *T*, generată ca răspuns la un stimul antigenic specific, ucide iniţial sub restricţie MHC, iar ulterior, în afara acestei restricţii. Fenomenul a fost observat pe culturi de limfocite *in vitro* şi s-a dovedit clar că celula citotoxică este într-adevăr limfocit *T*, deoarece anticorpii anti-*CD*3 anulau efectul citotoxic. După alţii, *CD*45 ar fi o structură potenţială de activare a citotoxicităţii în afara restricţiei MHC, iar IL-2 secretat de către limfocitele *T* ar putea activa exprimarea unor molecule de adezine ca *CD*11a/*CD*18, *CD*54 (ICAM-1) şi *CD*2 pe celulele *NK*. De asemenea, activarea exprimării unor astfel de molecule pe limfocitele *T* le-ar permite să interacţioneze cu un spectru mai larg de ţinte şi ar explica în parte de ce se amplifică potenţialul de citotoxicitate a limfocitului *T* în prezenţa unor concentraţii mari de IL-2. Acestea, cultivate în prezenţa de IL-2 ar efectua funcţii citotoxice fără restricţii MHC, similare celor *NK*. Nu se cunoaşte însă dacă această capacitate de citoliză este proprie tuturor limfocitelor *T* sau numai unor anumite celule din această clasă. În orice caz, efectoarele *NK* ar reprezenta o formă primitivă de celule citotoxice în comparaţie cu cele *T*c care, deşi se leagă la ţintă prin interacţiuni receptor-ligand de genul *CD* 2-*LFA* 3 sau *LFA* 1-*ICAM* 1, ar fi lipsite de un receptor specific sofisticat, de genul celui existent la limfocitul *T* sau *B*. Aceşti receptori "sofisticaţi" ar fi molecule adăugate în cursul evoluţiei filogenetice, care au fost asociaţi unor receptori monomorfici mai vechi, de genul *CD* 2 sau *LFA*-1, prezenţi pe *NK*, dar rămaşi activi şi la nivelul limfocitelor *T*c unde funcţionează ca "receptori accesorii". Aşadar, limfocitele *T* citotoxice, în special cele cu receptori $\gamma\delta$ ar reţine "funcţia ancestrală *NK*" putând fi implicate în recunoaştere în afara restricţiei MHC, la care s-au adăugat funcţii de recunoaştere noi şi mult mai eficiente.

Studiul reacţiilor imune la vertebrate este o sursă importantă de informaţii care ar putea deveni utilă descifrării unor necunoscute în sfera apărării imune a omului, nu numai faţă de agresori externi, dar chiar şi în situaţii de autoagresiune. De exemplu, metamorfoza amfibiilor şi toleranţa formelor intermediare faţă de antigenele adulte ar putea contribui la explicarea mecanismelor prin care funcţiile imune mediate celular sunt influenţate şi în corelaţie cu reglarea neuroendocrină.

## ONTOGENIA IMUNOCOMPETENŢEI

Studiile efectuate pe embrionii de oaie, găină, şoarece, opossum etc. demonstrează că păsările şi în special mamiferele îşi dobândesc imunocompetenţa faţă de diferite antigene la stadii diferite de dezvoltare în ontogenie. Maturarea imunologică, privită din acest punct de vedere, apare ca un proces extrem de bine reglat, alcătuit din "momente" precise de dobândire a competenţei, când fetusul se dovedeşte capabil să dezvolte reacţii imune faţă de un anumit antigen, dar este total indiferent faţă de alte antigene. Această receptivitate diferenţiată faţă de antigene nu este condiţionată în exclusivitate de exprimarea receptorilor pentru unii epitopi de pe suprafaţa membranei unor clone de limfocite *T* sau *B* şi lipsa de exprimare a receptorilor pentru alţi epitopi deoarece, în cazul limfocitelor *B* de exemplu, clonele predestinate să reacţioneze cu diverşi epitopi îşi exprimă receptorii specifici cu mult înainte de sinteza anticorpilor.

Dacă la păsări ovulul fecundat întrerupe orice legătură de ordin anatomic sau fiziologic cu organismul matern, procesul de formare a embrionului şi de ecloziune având loc în afara acestuia, la mamifere, atât înainte cât şi imediat după naştere, produsul de concepţie este mai mult sau mai puţin dependent din punct de vedere

imunologic de protecţia conferită de către mamă. De aceea, dezvoltarea în ontogenie a sistemului imun la mamifere se face atât în contextul relaţiilor materno-fetale, cât şi în afara acestora. Cu alte cuvinte, fetusul îşi dezvoltă propriul sistem imun la adăpostul şi sub controlul mijloacelor de apărare maternă.

## RELAŢIILE MATERNO-FETALE

O problemă spinoasă, nesatisfăcător explicată, este cea a toleranţei fetale. Încă nu se ştie precis cum este posibil ca un organism, care posedă 50% din antigenele MHC moştenite de la un părinte, să fie tolerat luni de zile de către organismul matern. Pentru explicarea acestui paradox imunologic au fost postulate mai multe ipoteze care susţin că: antigenele fetale sunt slab dezvoltate, placenta acţionează ca o barieră anatomică între mamă şi fetus sau că reacţiile imune ale mamei sunt depresate în cursul sarcinii, de unde incapacitatea ei de a recunoaşte şi elimina grefa fetală. Totuşi, numeroase date experimentale au demonstrat că nici una dintre aceste ipoteze nu este riguros exactă. Lucrările din ultimele decenii au stabilit precis că antigenele MHC sunt exprimate foarte de timpuriu pe suprafaţa celulelor fetale, şi că *in vitro* pot stimula limfocitele materne care le recunosc ca străine şi reacţionează specific faţă de ele. Faptul că *in vivo*, în mod normal, aceste reacţii au loc s-ar datora existenţei barierei placentare care ar izola fetusul de mamă, astfel încât stimulii antigenici fetali nu mai sunt accesibili sistemului imun matern. Dar, numărul straturilor placentare care formează această barieră diferă de la o specie la alta. La unele specii, la care placenta are un număr mai mare de straturi, izolarea fetusului de mamă este mai bună, în timp ce la altele, cu un număr mai mic de foiţe placentare, este mai slabă. În prima situaţie, principala cale de acces a anticorpilor protectori de la mamă la produsul de concepţie este cea colostrală, iar în cea de a doua, cea placentară. Dar, atât prin placentă cât şi prin colostru, în afară de anticorpi trece un număr considerabil de macrofage, limfocite, granulocite etc. Dacă placenta nu este o barieră perfectă, înseamnă că intervin factori supresori, care frânează multiplicarea şi reacţiile limfocitelor materne. Numeroase observaţii au implicat foiţa trofoblastică a placentei ca responsabilă de realizarea barierei. Celulele sale sunt neantigenice deoarece nu exprimă pe suprafaţa lor aloantigene, fiind deci "un ţesut privilegiat imunologic". Pe de altă parte, atât mama cât şi fetusul produc factori depresori ai reacţiilor imune.

În sarcină ar fi un echilibru inversat între limfocitele $T\,h_1$ şi cele $T\,h_2$ şi, deci, între citokinele IL-2 şi IFN$\gamma$ secretate de către $T\,h_1$ şi IL-4, IL-5, IL-10 secretate de către $T\,h_2$. Primele, stimulând imunitatea mediată celular, inhibă proliferarea $T\,h_2$ şi tolerarea fetusului de către organismul matern. La rândul lor, limfocitele $T\,h_2$ inhibă profund sinteza limfokinelor de către $T\,h_1$ şi favorizează acceptarea fetusului.

Inocularea la şoarece de IL-3, G-CSF, G-CSF, GM-CSF stimulează creşterea şi diferenţierea trofoblastelor, mărind supravieţuirea fetuşilor, pe când inoculul de IL-2, IFN$\gamma$ sau TNF are efecte vătămătoare asupra acestora.

La femeia gravidă, reacţiile imune mediate celular sunt depresate, în timp ce imunitatea umorală este activată. Aşa se explică de ce în sarcină artrita reumatoidă se ameliorează clinic, iar sinteza de anticorpi faţă de unii stimuli antigenici este mult mai mare în comparaţie cu răspunsul femeilor normale expuse aceloraşi stimuli antigenici. În esenţă, naşterea ar fi o expresie a scăderii rapide a sintezei

de către $T\,h_2$ a citokinelor IL-4, IL-5 şi IL-10 şi o activare a funcţiilor secretorii ale limfocitelor $T\,h_1$ cu eliberare de IFN$\gamma$, IL-2 etc.

Pe lângă schimbările hormonale ce au loc în această perioadă la femeie şi care pot controla nespecific aceste reacţii, apare o serie de molecule de $\alpha$- sau $\beta$-globuline cu rol imunoreglator. Şi fetusul poate produce substanţe imunoreglatoare de genul alfa-feto-proteinei sau fetuinei, a căror concentraţie mare în lichidul amniotic şi în plasmă interferă cu diverse funcţii imune, inclusiv cu cele ale limfocitelor *T* citotoxice. Alături de aceşti factori moleculari, la fetus predomină limfocitele *T* supresoare, care inhibă proliferarea limfocitelor materne. Deci, interacţiile materno-fetale sunt extrem de complexe şi multifuncţionale. Pe de o parte ele conferă protecţie organismului în formare, iar pe de altă parte, îi creează toate condiţiile necesare dezvoltării sistemului imun propriu. Protecţia vizează atât izolarea biologică faţă de agresiunea celulelor imunocompetente materne, cât şi izolarea faţă de agresiunea factorilor de mediu care au un acces limitat şi controlat la produsul de concepţie.

Fetusul primeşte anticorpii materni protectori predominant din clasa IgG, transferaţi activ datorită fragmentului *Fc*, care se fixează pe receptorul pentru *Fc* de pe trofoblast. Deoarece, în mod normal, el este apărat pe de o parte de anticorpii pe care-i primeşte pasiv iar pe de altă parte este izolat de stimulii antigenici externi, în prima jumătate a vieţii intrauterine nu-şi sintetizează anticorpi proprii, deşi în mare măsură este capabil să o facă.

Experimentele pe fetuşi de oaie, şoareci etc. au demonstrat fără echivoc că organismele în formare sunt parţial imunocompetente cu mult înainte de a se naşte. Deci, multe componente ale sistemului imun, în stadiul fetal, pot recunoaşte antigenele MHC, antigenele bacteriene, virale etc. şi pot reacţiona faţă de ele. Acest fapt este evident atât *in vivo,* cât şi *in vitro,* unde influenţa factorilor supresori din organism poate fi înlăturată.

## ONTOGENIA SISTEMULUI IMUN

Maturarea organelor şi funcţiilor imune la mamifere începe încă din primele stadii de dezvoltare embrionară şi continuă până în perioada perinatală, dobândirea imunocompetenţei realizându-se pe două planuri diferite: pe cel al formării organelor limfoide şi pe cel al maturărilor funcţionale. Mai întâi se formează organele limfoide primare şi ulterior cele secundare. Pot fi considerate organe limfoide specifice vârstei embrionare sacul vitelin şi ficatul, la nivelul cărora se formează celulele suşă generatoare ale diferitelor linii celulare, inclusiv cea limfoidă. După cum se ştie, din celula suşă şi apoi din hemocitoblaştii dezvoltaţi în sacul vitelin şi ulterior în ficatul embrionar, descind celulele care vor evolua pe direcţia hematopoietică sau limfopoietică, din ultima derivând limfocitele care se vor matura fie la nivelul timusului, fie la nivelul măduvei osoase.

Rezultă două clase de celule a căror maturare ontogenică, respectiv dobândirea de markeri, de receptori şi de competenţă funcţională se realizează în trei secvenţe diferite: *a)* în stadiul premergător organului limfoid primar, deci pe parcursul de la celula suşă la timus sau măduva osoasă; *b)* în interiorul organelor limfoide şi *c)* după ce au părăsit organele limfoide primare.

Limfocitele *B* de exemplu, la embrionul de şoarece recunosc secvenţe bine precizate în dezvoltarea lor ontogenică. Un prim val de celule suşă invadează rudimentul de ficat, venind dinspre sacul vitelin în ziua a 9-a; al doilea val, în jurul

zilei a 10-a şi continuă până aproape de momentul naşterii. La embrionul de 11-13 zile, apar în ficat limfocite pre-*B* mari, cu lanţ $\mu$ intracitoplasmatic care, după 2 - 3 zile, converg spre celulele *B* cu receptori imunoglobulinici (tabelul 105).

*Tabelul 105*

**Prezenţa limfocitelor pre-*B* la şoarece ($\mu^+$) în cursul vieţii embrionare şi postnatale**

| Organul | Vârsta embrionară (zile) la care sunt prezente limfocitele pre-*B* | Durata în zile a persistenţei după naştere |
|---|---|---|
| Ficat | 9 - 11 | 14 |
| Splină | 14 - 15 | 21 |
| Oase lungi | 16 - 17 | Luni sau ani |

După prima săptămână de la naştere, populaţia pre-*B* scade, iar la două săptămâni dispare total din ficat. În splină, celulele pre-*B* apar la 15 zile, ating maximum la naştere şi dispar la cca. trei săptămâni de viaţă extrauterină. Şi la celelalte specii de animale, precursorii *B* apar în ficatul embrionar, după care în măduvă, unde se găsesc practic toată viaţa. Se pare că există două modalităţi diferite de maturare a precursorilor: una aflată sub control strict genetic, independentă de intervenţia stimulului antigenic şi alta dependentă de acesta (fig. 197).

În cazul limfocitelor *B* şi, poate, şi în cel al limfocitelor *T*, între faza de control genetic şi cea de intervenţie a antigenelor, ar exista un stadiu intermediar în care intervin stimuli mitogenici. De exemplu, limfocitul *B*, odată derivat din hemocitoblast, devine precursor *B* care îşi sintetizează lanţul $\mu$. Acesta nu va fi exprimat la suprafaţa membranei, ci va rămâne în interiorul celulei. În stadiul următor, au loc

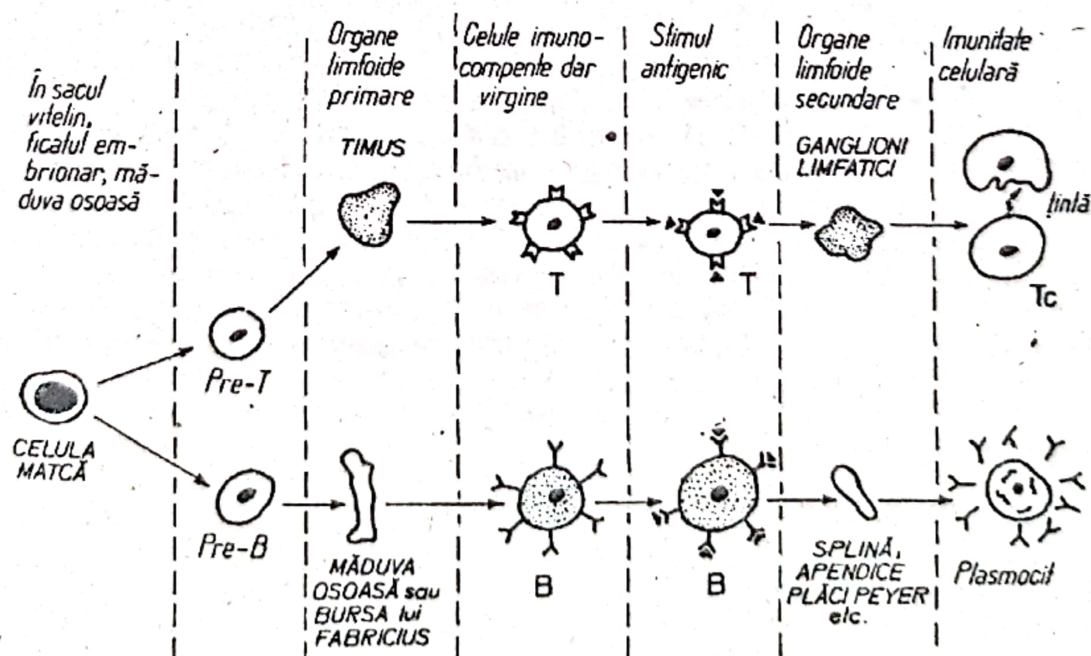



Fig.197. Evoluţia ontogenică a limfocitelor T şi B, de la stadiul de precursori pre-T sau pre-B până la stadiul final de celule efectoare T citotoxic (Tc) sau plasmocit.

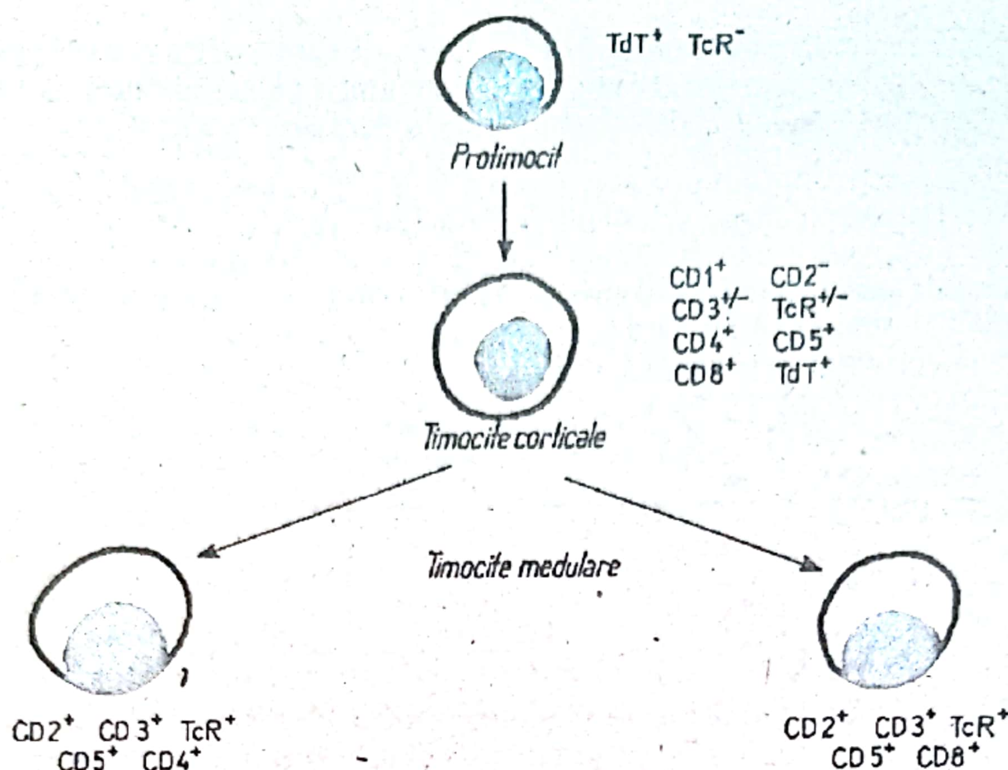



Fig.198. Evoluţia ontogenică a limfocitului T. De la stadiul timpuriu de protimocit imatur funcţional, lipsit de receptori pentru antigen ($TcR^-$) şi bogat în enzima deoxiribonucleotidiltransferază ($TdT^+$), celula T îşi capătă şi pierde diferiţi markeri până când ajunge la stadiul final de celule Th ($CD4^+$) sau Ts ($CD8^+$).

sinteza lanţului *L* şi exprimarea la nivelul membranei a receptorului IgM. În această fază de dezvoltare, limfocitul este "incompetent" imunologic, un fel de "copil *B*" domiciliat la nivelul măduvei. Până acum, toate fazele evolutive sunt controlate genetic şi independente de antigen. În stadiul următor, sub influenţa stimulilor mitogenici pentru care celula îşi are deja exprimaţi receptorii, apar receptorii pentru antigen din clasa IgD şi, după caz, IgG sau IgA. Celula este deja competentă imunologic dar "virgină", în sensul că încă nu a avut prilejul să-şi exprime competenţa dobândită. De abia sub influenţa antigenului şi, după caz, a limfocitelor *T* ajutătoare, devine plasmocit secretor de IgM, IgG, IgA etc. La vârsta de 9-10 zile, embrionii au în sacul galben progenitorii *B* care trec în ficatul embrionar şi apoi în măduva osoasă. La nivelul osului, progenitorii pre-*B* se găsesc în regiunea externă a măduvei, în imediata apropiere a peretelui osos, iar celulele *B* mature care exprimă deja receptorii IgM/IgD sunt localizate spre centrul măduvei. Nu se cunosc încă prea multe date referitoare la semnalele care generează evenimentele genetice şi moleculare care acţionează pentru declanşarea şi exprimarea receptorilor pe suprafaţa membranei limfocitelor *B*. Se pare că o contribuţie importantă la menţinerea limfocitelor *B* în măduva osoasă ar avea-o macrofagele. De asemenea, pentru diferenţiere, precursorii *B* foarte timpurii ar necesita unele condiţii "mieloide", contactul direct cu celulele stromale fiind esenţial pentru generarea şi maturarea lor.

Markerii antigenici de pe suprafaţa limfocitelor sunt exprimaţi în secvenţe diferite de timp în cursul evoluţiei ontogenice, unul şi acelaşi marker putând dispărea într-o fază evolutivă şi reapărea în alta, pentru ca în final să persiste numai cei care definesc populaţia de celule adulte (fig. 198).

Maturarea precursorilor *T* la nivelul timusului şi modul de apariţie a diferitelor subpopulaţii nu sunt încă bine cunoscute. Se ştie că precursorii *T* sosiţi în timus

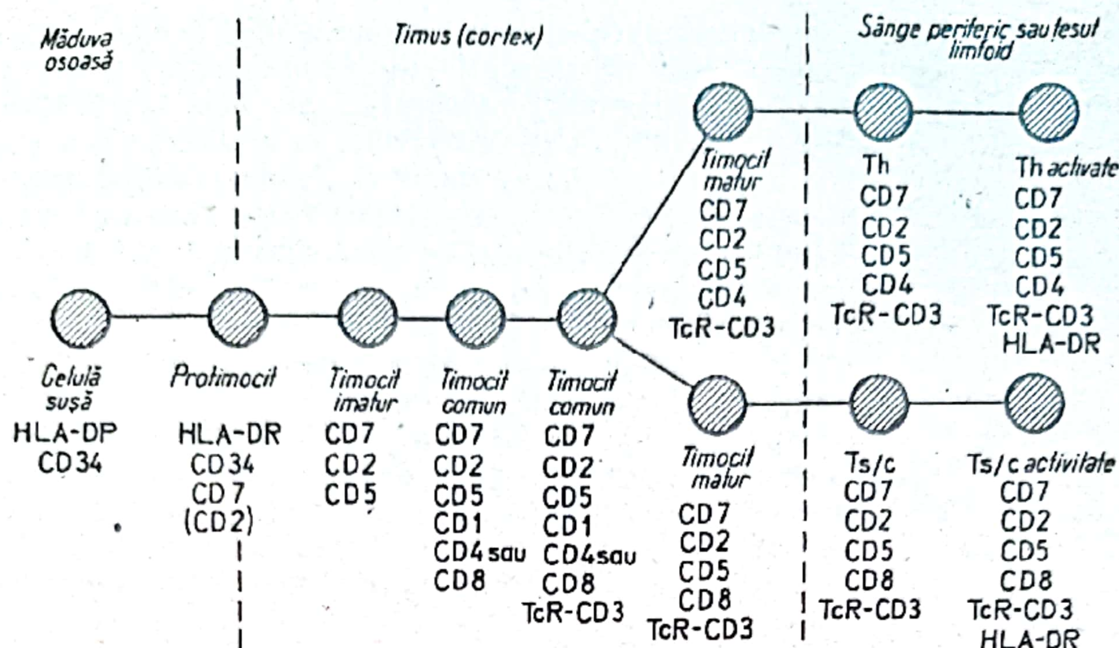



Fig.199. Schema ipotetică a diferenţierii limfocitelor T umane în cursul evoluţiei ontogenice (după J.J.M. Van Dongen şi col.)

nu au nici o funcţie, până la maturarea lor existând mai multe etape în cursul cărora au loc achiziţii şi pierderi de caractere fenotipice. Acestea sunt expresia unor mutaţii în sinteza proteinelor care afectează secvenţa aminoacizilor şi integritatea funcţională a proteinei. Celula *T* în cursul dezvoltării exprimă un număr diferit de antigene de suprafaţă care permit interacţia cu microclimatul înconjurător, microclimat care-i va influenţa şi regla dezvoltarea (fig. 199).

Diferenţierea timocitelor începe de la precursorii timpurii *CD*3$^-$, *CD*4$^-$, *CD*8$^-$ din regiunea subcapsulară, mergând spre formele imature *CD*3$^-$ *CD*4$^+$ *CD*8$^-$, sau *CD*3$^-$ *CD*4$^-$ *CD*8$^+$ şi apoi *CD*3$^-$ *CD*4$^+$*CD*8$^+$ în corticală, pentru ca, în final, să ajungă la forma matură *CD*3$^+$*CD*4$^+$ sau *CD*3$^+$ *CD*8$^+$ din medulară. În cursul acestui proces este o relaţie complexă între celulele stromei timusului, precursorii limfocitari şi citokine. Precursorii veniţi din măduva osoasă intră în timus prin joncţiunea cortico-subcapsulară şi cortico-medulară graţie unor molecule chemoatractante cu rol de receptori ca *CD*44 (integrina $\beta$1), un receptor care leagă acidul hialuronic, *CD*49d (*VLA*-4), *CD*49e (*VLA*-5) care asigură accesul în timus, *CD*49f (*VLA*-6) care aderă secvenţial la un complex integrat de fibre de reticulină, laminină, fibronectină, glucozaminoglicani etc. Primul contact al precursorilor se face cu celulele endoteliului vascular. Sub influenţa microclimatului cortical timocitele modulează mai intens exprimarea *CD*25 şi *CD*44 şi apoi a *CD*4 şi *CD*8, ca o consecinţă a exprimării şi rearanjării lanţului $\beta$ al receptorului pentru antigen de pe limfocitul *T*. Migrarea în acest organ începe de la nivel subcapsular şi are loc pe măsura diferenţierii celulare în cursul căreia se realizează angajarea celulelor pe linia maturării, proliferării şi rearanjării genelor TCR şi exprimarea de receptori pentru citokine. Ea este mediată de către proteinele contractile (actină) şi componentele matriţei extracelulare ale celulelor stromale (FN, LM) care interacţionează cu receptorii exprimaţi pe timocitele imature, favorizând aderarea celulelor şi interacţiuni secvenţiale mediate de receptori de membrană şi de coreceptori exprimaţi pe timocite şi pe celulele din stroma timusului.

În nucleul celulelor limfoide imature, ca şi în timocitele din corticala timusului este prezentă enzima deoxinucleotidil-transferază (TdT), care lipseşte la

limfocitele *T* mature. Enzima are rolul de control al inserţiei nucleotidelor la situsurile de unire a segmentelor de gene, în timpul rearanjării genelor care controlează organizarea receptorilor pentru antigen pe suprafaţa celulei *T*. Precursorii limfoizi din măduvă exprimă atât HLA-DR cât şi markerul *CD*34, la care se asociază ulterior *CD*2 şi *CD*7 care se menţin pe tot timpul maturării limfocitului. Markerul antigenic *CD*5 este prezent pe timocitele corticale şi pe limfocitul *T* matur, pe când *CD* 1 apare la precursorii din corticala timusului, fiind un marker "comun" pentru timocite. Multe timocite corticale sunt $CD4^+CD8^+$, pe când cele din periferie sunt fie $CD4^+$, fie $CD8^+$.

Complexul *CD*3-TCR ($CDR^+$ receptorul pentru antigen pe limfocitele *T*) este exprimat pe 60 - 65% din populaţia de timocite normale, dintre care numai 0,2 - 1% exprimă receptori $T\gamma\delta$. În periferie, majoritatea (85 - 95%) exprimă receptori $\alpha\beta$, iar 2 - 15 $\gamma\delta$. Deci, receptorii $T\gamma\delta$ se formează practic la nivelul măduvei osoase şi nu la nivelul timusului, fapt care sugerează că celulele cu aceşti receptori suferă o diferenţiere minoră în timus, de unde speculaţia că ele ar fi o reminiscenţă pe plan filogenetic care a apărut pe scară evolutivă înainte de apariţia timusului ca organ limfoid central.

La mamifere, maturarea timocitelor depinde de evitarea a două tipuri de moarte programată: o selecţie negativă care constă din eliminarea celulelor al căror TCR reacţionează prea eficient cu propriile structuri ale organismului, şi o selecţie pozitivă prin care sunt eliminate celulele nefuncţionale. În cursul selecţiei negative sunt eliminate celulele care pot recunoaşte peptidele autologe prezentate în asociere cu MHC autolog, moartea celulei fiind indusă de complexul MHC+ peptide exprimată pe celula prezentatoare de antigen (macrofag).

Selecţia pozitivă permite dezvoltarea şi maturarea limfocitelor purtătoare de receptori pentru antigen care sunt capabile să recunoască peptidele non-proprii în asociere cu moleculele MHC de clasa I sau II, permiţându-le maturarea ulterioară.

Susceptibilitatea la aceste două modalităţi de selecţie depinde de exprimarea TCR pe timocite, de fenotipul MHC din mediul timic şi de specificitatea receptorilor pentru epitopi proprii sau non-proprii. La şoarece, mor zilnic în timus cca. $5 \cdot 10^7$ celule, la fiecare 3-4 zile fiind înlocuite toate cu progenitori noi. Majoritatea mor în cortexul timusului, dar se pare că multe mor şi după ce au părăsit organul, adică după ce au trecut prin medulară şi au ajuns în circulaţia periferică. La celulele imature $CD4^-CD8^-$, primul lanţ care se exprimă este polipeptidul $\alpha$ al TCR, rearanjările locusului $\alpha$ permiţând exprimarea receptorilor $\alpha\beta$ numai către sfârşitul proliferării intratimice, după care urmează selecţia negativă cu blocarea celulelor $CD4^+$ sau $CD8^+$. Selecţia pozitivă ar avea loc ulterior, cu mult după exprimarea TCR, fiind eliminate toate celulele $CD4^+CD8^+$ rămase impotente reacţional nu numai faţă de stimulii liganzilor specifici pentru TCR, dar şi la diverşi agenţi farmacologici cum ar fi ionoforii de $Ca^{2+}$ sau forbol-esterii. De fapt, timocitele din corticala timusului nu sunt complet lipsite de posibilităţile de reacţie la unii stimuli; ele posedă protein-kinaze, ca de pildă protein-kinaza C, şi pot exprima *in vitro* receptori pentru IL-2, deşi sunt încă defective în transmiterea semnalelor.

Selecţia în timus nu implică modificări ale receptorului pentru antigen, ci moartea sau salvarea de la moarte. Asupra destinului acestora exercită o influenţă hotărâtoare înseşi proteinele receptorului pentru antigen, în sensul că celulele care au sintetizat lanţul $\alpha$ al acestui receptor mor dacă nu-şi pot sintetiza şi lanţul $\beta$ pentru a forma heterodimerul $\alpha\beta$ al receptorului (selecţie pozitivă). Iniţial, lanţul $\beta$ al receptorului pentru antigen, asociat complexului *CD*3 ar controla expansiunea timocitelor imature şi transcrierea lanţului $\alpha$ pentru ca, ulterior, controlul să fie






exercitat de către heterodimerul complet. În acest stadiu, ar fi eliminate celulele care nu pot recunoaşte liganzii de adeziune intercelulară şi cele care recunosc peptidele proprii (selecţie negativă). Scăpate de aceste selecţii, celulele încep să exprime un număr tot mai mare de receptori pe suprafaţa membranei lor, evoluând spre $CD4^+$ sau $CD8^+$.

Se poate spune deci că, în timus, protimocitele, precursorii cei mai imaturi, se găsesc în zona subcorticală a organului. În zona corticală sunt celulele *T* în curs de maturare, iar în medulară, celulele *T* competente. Evenimentele proliferative au loc în regiunile exterioare ale organului, pe când rearanjările genelor receptorilor şi exprimarea proteinelor controlate de ele au loc în cortex.

Aşadar, la nivelul timusului ar fi cca. 2 - 6% celule $CD4^-CD8^-$ care reprezintă populaţia precursoare cea mai imatură, 70 - 80% celule $CD4^+CD8^+$, dintre care majoritatea vor muri, şi 15 - 20% celule $CD4^+CD8^-$ sau $CD4^-CD8^+$ prezente în medulară, din care o parte vor muri aici, iar altă parte în periferie, motivele acestei selecţii târzii nefiind elucidate până în prezent. Se pare că o linie de celule *T* derivate din timus nu respectă "regulile clasice" ale selecţiei pozitive şi negative. Ele nu au heterodimerul $\alpha\beta$ ci homodimerul $\alpha\alpha$ şi ar recunoaşte antigenele proprii, fiind probabil responsabile, în condiţii încă neelucidate, de reacţii autoimune atunci când scapă de sub controlul celorlalte populaţii de celule reglatoare.

Se ştie că în timus există două tipuri de limfocite care diferă între ele în privinţa densităţii, caracterelor antigenice de membrană şi orientării spre funcţii efectoare. O populaţie eterogenă ca volum şi densitate se află în corticală, iar alta, mai omogenă, în medulară. În comparaţie cu cele din medulară, celulele din corticală sunt, după cum menţionam mai sus, mai imature funcţional, fapt care a condus la ideea că diferenţierea precursorilor timocitari spre celulele medulare, funcţional mai active, este consecinţa unei "bifurcaţii" care are loc într-un anumit punct al procesului evolutiv, pre- sau intra-timic. Studiile experimentale efectuate pe şoareci au evidenţiat faptul că, într-adevăr, la nivelul acestui organ există două tipuri de celule: unul care exprimă slab antigenul Thy-1 şi intens antigenele *H*-2 şi altul care exprimă intens Thy-1 şi slab H-2, exprimându-se diferite ipoteze care încearcă să explice procesul de maturare intratimică.

Ceea ce este sigur, este faptul că maturarea precursorilor la nivelul organului limfoid primar nu este absolută, o parte din progenitori ajungând în periferie unde procesul de formare a celulelor imunocompetente continuă. El ar avea loc la nivelul epidermului, care ar fi un organ imunologic comparabil cu timusul şi care ar favoriza diferenţierea şi proliferarea unor populaţii T prin intermediul unor citokine secretate local. Aceste populaţii ar fi atrase aici de către factori locali prin aceleaşi mecanisme de "homing" ca şi cele care realizează homing spre timus, aderarea făcându-se prin *CD*3 şi LFA-1.

Acest fapt obligă la reticenţe şi la prudenţă atunci când se trag concluzii în biologie, deoarece schemele rigide nu sunt cele mai indicate pentru analiza şi înţelegerea corectă a fenomenelor. În cazul limfocitelor *T*, al celor *B* şi poate şi al altor celule, există fără discuţie diferite trepte de evoluţie ontogenică, dar fenomenele care au loc la nivelul acestora nu trebuie absolutizate. O celulă precursoare îşi capătă imunocompetenţa la nivelul timusului, dar mai poate scăpa de la "şcoală" cu "lecţia neterminată", urmând s-o termine în afara ei.

# IMUNITATEA ANTIVIRALĂ, ANTIBACTERIANĂ ŞI ANTIPARAZITARĂ

Epidemiile, aceste groaznice flagele care au secerat atâtea vieţi şi au provocat uriaşe pagube materiale, au permis o observaţie empirică importantă atât din punct de vedere practic, cât şi teoretic: faptul că supravieţuitorii unui flagel deveneau rezistenţi la un nou contact cu agentul etiologic al bolii respective a sugerat ideea că acest agent, pe lângă boală şi moarte, poate conferi, în anumite condiţii, rezistenţă organismului. Aşa s-a ajuns la introducerea în practică a infecţiilor deliberate, realizate iniţial cu germeni virulenţi şi ulterior cu germeni atenuaţi sau omorâţi (vaccinări), mijloace care au permis stăpânirea bolilor contagioase şi chiar eradicarea unora dintre ele, cum este cazul variolei umane considerată eradicată pe globul pământesc din anul 1980.

Succesul programelor de vaccinare nu se limitează numai la aceste aspecte de ordin practic. Ele au generat un domeniu ştiinţific nou, imunologia, care, pornind de la studiul mecanismelor care stau la baza apărării antimicrobiene, a ajuns în zilele noastre să-şi diversifice atât de mult obiectivele încât, aparent, domeniile ei actuale de preocupări sunt foarte îndepărtate de cele iniţiale. Recentele progrese în diferitele domenii ale biologiei celulare şi geneticii, cum ar fi hibridoamele celulare, sinteza peptidelor, tehnologiile ADN recombinat etc., progrese care permit o analiză aprofundată a mecanismelor răspunsului imun protector, au scos în evidenţă existenţa unor lacune serioase în manipularea antigenelor, estimarea acţiunii protectoare a vaccinurilor sintetice, a mecanismelor care stau la baza reacţiilor de agresiune sau autoagresiune postvaccinală etc. Din această cauză, au revenit în actualitate preocupările care ţintesc elucidarea mai aprofundată a mecanismelor care intervin în apărarea imună faţă de diverse microorganisme şi a modului de influenţare a lor.

## CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR ŞI BACTERIILOR PATOGENE SAU SAPROFITE. RELAŢII POSIBILE ALE ACESTORA CU ORGANISMUL GAZDĂ

Dimensiunile submicroscopice sau microscopice ale virusurilor şi bacteriilor, dependenţa lor totală sau parţială de gazdă, care le conferă statutul lor de parazit sau saprofit, viteza rapidă de multiplicare etc. constituie caracteristici generale ale virusurilor şi bacteriilor, care le deosebesc de celelalte forme de viaţă din biosferă.

Dar, pe lângă aceste caractere comune, există şi deosebiri fundamentale atât între virusuri şi bacterii, cât şi între diverse subpopulaţii ale acestora. Astfel, virusurile, deşi sunt de dimensiuni diferite, cu proprietăţi antigenice şi complexităţi structurale diferite, sunt în esenţă organisme inferioare, lipsite de dotarea biochimică necesară realizării proceselor biologice vitale, din care cauză numai parazitismul intracelular obligatoriu le asigură supravieţuirea şi multiplicarea. O particulă virală completă este, de fapt, un material genetic format din ADN sau ARN, înconjurat de o peliculă proteică - capsida - care conferă atât protecţie acizilor nucleici, cât şi posibilităţi de legare a virionului la receptorul de pe membrana celulei pe care urmează să o infecteze.

Numărul de gene proprii pe care le posedă un virus este extrem de mic - între 3 şi 250 - motiv pentru care majoritatea virusurilor sunt nevoite să folosească genomul celulei gazdă. Mai mult, o parte dintre virusuri sunt lipsite de enzimele necesare replicării acizilor nucleici, fapt care le accentuează şi mai mult condiţia lor de dependenţă faţă de celulele procariote şi eucariote. Odată ajunşi în interiorul celulei, virionii îşi inseră modesta lor zestre genetică în genomul gazdei care va forma proteinele necesare multiplicării, după care, prin "burjonare" la nivelul membranei sau prin citoliză, părăsesc celula infectată pentru a infecta şi invada alte celule sănătoase aflate la distanţă sau în imediată vecinătate. Unii virioni rămân cantonaţi intracelular un timp îndelungat, exprimarea clinică a prezenţei lor devenind evidentă doar în situaţii extreme, care le condiţionează multiplicarea şi infectivitatea. Alţii declanşează necondiţionat boala care devine evidentă clinic cu simptomatologia caracteristică agentului viral incriminat. Şi într-un caz şi în celălalt, virusul perturbă sistemul imun al gazdei, fie prin distrugerea celulelor infectate - efect citopatic - fie prin alterarea funcţiilor lor. Prima situaţie este o consecinţă directă a replicării "productive", când virusul se multiplică, inhibă sinteza proteinelor celulei gazdă şi altereazä integritatea ei structurală. În cea de-a doua situaţie, virusurile non-citopatice nu afectează integritatea celulară, dar inhibă sau denaturează unele funcţii importante ale ei. În cazul în care sunt infectate limfocitele, macrofagele sau alte celule ale sistemului imun (tabelul 106), consecinţa directă a replicării virale asupra funcţiilor imune este condiţionată de populaţia celulară afectată: apariţia bolilor de autoagresiune în cazul infectării limfocitelor *T* supresoare ($T_s$), a imunodeficitelor severe atunci când sunt interesate celulele *T* ajutătoare (*T* h), a imposibilităţii de rejecţie a diferiţilor agresori străini sau a grefelor de tesuturi ca urmare a distrugerii limfocitelor *T* citotoxice (*T*c) etc.

Virusurile non-citopatice alterează eliberarea unor factori solubili cu rol important în reglarea răspunsului imun, cum ar fi limfokinele sau monokinele. Ca urmare a acestor interferenţe, prezenţa virusului, chiar dacă nu duce la distrugerea celulei, generează grave disfuncţii ale sistemului imun în totalitatea sa. De exemplu, interleukina-1 (IL-1), secretată de către macrofage, este o monokină care intervine ca al 2-lea semnal inductor al proliferării limfocitelor *Th* stimulate de către antigenul inductor al semnalului 1. În cazul denaturării moleculei sau al alterării sintezei sau secreţiei IL-1, răspunsul imun nu mai are loc, instalându-se imunosupresia sau toleranţa imunologică.

*Tabelul 106*

**Virusuri care infectează limfocitele şi monocitele (după M.B.McChesney şi M.B.A.Oldstone)**

| Virusul | Gazda | Celule infectate |
|---|---|---|
| *ADN dublu catenar* | | |
| Virusul hepatitei B | - Om, maimuţă | - Limfocite *T*, *B* |
| Papovavirusuri | - Om , maimuţă | - Limf. sânge periferic |
| Adenovirusuri grup C | - Om | - Limf. *T*, *B*, celule nule |
| Virusul herpes simplex | - Om | - Limfocite *T* |
| Virusul citomegalic | - Om | - Limfocite, monocite |
| Virusul Epstein-Barr | - Om | - Limfocite *B* |
| Virus Pox | - Iepure | - Limfocite splenice |
| *ADN monocatenar* | | |
| Parvovirusuri | - Porc | - Limfocite splenice |
| Virusul murin | - Şoarece | - Limfocite |
| *Catenă pozitivă ARN* | | |
| Poliovirusuri | - Om | - Limfocite, monocite |
| Rubeola | - Om | - Limfocite *T*, *B* |
| *Catenă negativă ARN* | | |
| Virusul rujeolic | - Om | - Limf. *T*, *B*, monocite |
| Virusul sinciţial respirator | - Om | - Limfocite, monocite |
| Virusul stomatitei veziculoase | - Om, şoarece | - Limfocite *T* |
| Virusul influenţei A | - Om | - Limfocite, monocite |
| *ARN ambisens* | | |
| V. coriomeningitei limfocitare | - Şoarece | - Limf. *T*, *B*, monocite |
| *Retrovirusuri* | | |
| Virusul leucemiei murine | - Şoarece | - Limfocite *B* |
| Virusul leucemiei feline | - Pisică | - Limf. *T*, *B*, macrofage |
| HIV | - Om | - Limf. *T*, monocite |

O altă consecinţă a impactului unor virusuri cu celulele sistemului imun este proliferarea limfocitară necontrolată, care generează un număr mare de limfocite nefuncţionale, responsabile în final de "sufocarea" şi distrugerea organismului. Este cazul leucemiilor, de genul leucozelor bovine, boli cu profunde implicaţii de ordin biologic şi economic. Şi bacteriile, indiferent că sunt patogene sau

condiţionat patogene,se deosebesc între ele printr-o multitudine de caractere cum ar fi: forma, dimensiunile celulei, prezenţa sau absenţa cililor, capsulei, sporilor, afinităţile tinctoriale, necesităţile metabolice, capacitatea de sinteză sau de secreţie a toxinelor etc. Dar, spre deosebire de virusuri, unde există cazuri de tropism în exclusivitate pentru anumite celule ale sistemului imun, cum ar fi HIV sau virusul Epstein-Barr cu tropism pentru limfocitele *T* h, respectiv *B* umane etc., nu se cunosc specii de bacterii care să paraziteze în exclusivitate organele sau celulele sistemului imun. Totuşi, chiar dacă bacteriile interesează celule, ţesuturi sau sisteme care nu intervin în apărarea imună, ele pot influenţa pozitiv sau negativ funcţiile imune, fie direct, datorită multiplicării masei bacteriene, fie indirect, prin produsele lor de metabolism. De exemplu, stafilococul Cowan are în componenţa peretelui celular o proteină cunoscută sub denumirea de proteina A stafilococică (SpA), cu afinitate pentru fragmentul *Fc* al moleculei IgG de la majoritatea speciilor de mamifere. Datorită acestui fapt, influenţa stafilococică poate modifica nivelul seric al imunoglobulinelor fixând citofil la peretele bacteriei (prin *Fc*) moleculele de IgG, fapt care antrenează modificări în eficacitatea funcţională a compartimentului imunităţii mediate umoral. Alte tulpini de stafilococ secretă SpA care, fixându-se pe *Fc* al moleculelor IgG circulante, vor modifica funcţiile fiziologice ale acestora.

*Vibrio holerae* secretă o toxină capabilă să stimuleze sinteza adenilat-ciclazei care, la rândul ei, va activa formarea cAMP, un inhibitor al funcţiilor imune mediate celular şi în special al celor citotoxice efectuate de către limfocitele *Tc* şi *NK*. Exemple de acest gen sunt numeroase, dar ele nu constituie obiectivul acestui material.

Dintre componentele unor bacterii care prezintă interes din acest punct de vedere, o menţiune specială merită, pentru efectul lor pozitiv asupra reacţiilor imune, lipopolizaharidele (LPS) a căror structură chimică este foarte bine cunoscută (v. fig. 8).

LPS, componente ale membranei exterioare a bacteriilor Gram-negative, posedă un spectru larg de activităţi biologice, care influenţează şi modelează funcţiile imune. Dintre aceste activităţi merită amintite: stimularea secreţiei de imunoglobuline şi a diviziunii celulare, în special a limfocitelor *B* de şoarece pentru care sunt activatori policlonali, activarea funcţiilor fagocitare ale macrofagelor şi în special a sintezei şi secreţiei unor monokine implicate în reglarea cooperării celulare, de genul IL-1, activarea unor subpopulaţii de limfocite *T* etc. Datorită acestor complexe proprietăţi biologice, LPS acţionează ca adevărate substanţe imunomodulatoare.

## DIFERITE MODALITĂŢI DE APĂRARE ANTIINFECŢIOASĂ A MAMIFERELOR

Modalităţile de apărare antiinfecţioasă a mamiferelor ar putea fi împărţite în două mari categorii: unele care sunt condiţionate de relaţiile dintre agresori şi altele care sunt condiţionate de organismul expus agresiunii.

În prima categorie trebuie menţionat antagonismul bacterian la baza căruia se găseşte competiţia pentru factorii nutritivi, producerea de substanţe inhibitoare de genul acizilor graşi, colicinelor, diverselor antibiotice etc. Exemplele de antagonism bacterian sunt numeroase. Este cazul relaţiilor dintre flora Gram-pozitivă şi cea Gram-negativă de la nivelul intestinului. În momentul scăderii, dintr-un motiv

sau altul, a populaţiei lactobacilare Gram-pozitive, proliferează necontrolat şi se acumulează în cantităţi cu mult peste normal germenii şi toxinele germenilor Gram-negativi, cu urmări grave pentru organismul gazdă. Când balanţa este în favoarea lactobacililor, populaţia Gram-negativă revine la nivel normal, organismul resimţind pozitiv această echilibrare.

Şi la nivelul pielii este o "balanţă ecologică" a microorganismelor cu rol important în protecţia anti-stafilococică, -streptococică, -fungică etc. Rolul acestei balanţe devine evident după administrarea masivă de antibiotice când, ca urmare a distrugerii bacteriilor, are loc o proliferare necontrolată a fungilor.

În afară de aceste competiţii directe interbacteriene, unele specii de germeni sau derivatele lor nu acţionează direct asupra altor specii, ci indirect, prin stimularea nespecifică a funcţiilor sistemului imun care, astfel activat, devine mai eficient în combaterea agresiunii, inhibând nespecific multiplicarea agenţilor infecţioşi. Aceste microorganisme sau componente ale lor sunt obiectul unor intense studii imunofarmacologice şi biochimice, deoarece există speranţa folosirii lor ca instrumente utile de combatere nespecifică a unor boli infecţioase sau neoplazice.

La rândul lor, modalităţile de apărare condiţionată de organism pot fi grupate în două categorii distincte, şi anume: a) modalităţi naturale, care asigură protecţia nespecifică faţă de toţi agresorii, indiferent de caracteristicile lor şi b) mijloace ale imunităţii dobândite, care asigură protecţia nespecifică şi care sunt condiţionate de caracterul antigenic şi de habitatul agentului implicat în agresiune.

În afară de mijloacele naturale nespecifice şi de cele dobândite, specifice, există şi efectori ai imunităţii care acţionează "selectiv". Aceşti efectori, pentru a-şi exprima funcţiile, nu au nevoie de proliferare specifică a clonelor, instalată consecutiv unui stimul primar sau secundar, dar nici nu distrug orice celulă ţintă (tabelul 107). Este cazul celulelor *NK*, efectoare ale citotoxicităţii naturale mediată celular, care lizează spontan celulele ţintă, fără a fi necesar un contact prealabil cu acestea, dar care "selectează" ţintele, distrugând numai pe unele, de preferinţă pe cele limfoblastice, pentru care au receptori şi pe care le recunosc selectiv. De asemenea, interferonii acţionează fără specificitate pentru virus, dar cu specificitate de specie.

*Tabelul 107*

**Mijloace nespecifice, selective şi specifice de apărare faţă de virusuri şi bacterii**

| Mod de acţiune | Apărarea se realizează prin: |
|---|---|
| Nespecific | Bariere organice (piele, mişcarea cililor)<br>Secreţii (glande lacrimale, sebacee, sudoripare etc.)<br>Temperatura corporală<br>Alţi factori bactericizi (lizozim, complement)<br>Fagocitoză primitivă (PMN etc.)<br>Mijloace oxigen-dependente ($O_2$, $^1O_2$, $HO^{\bullet}$, $H_2O_2$) |
| Selectiv | Citotoxicitatea naturală mediată celular (NK) |
| Specific | Mediată umoral (prin anticorpi)<br>Mediată umoral şi celular (ADCC)<br>Mediat celular - macrofage activate<br>- limfocite *T* citotoxice<br>- limfocite *T*d |

Antrenarea unora sau altora dintre mijloacele de apărare ale imunităţii dobândite este condiţionată de caracteristicile agresorului. De exemplu, bacteriile care trăiesc şi se multiplică în afara celulelor organismului gazdă sau în interiorul acestuia. Aceste particularităţi de habitat condiţionează la rândul lor natura reacţiilor imune de apărare specifică. Împotriva germenilor cu habitat extracelular sau a exotoxinelor, principalele mijloace specifice de apărare imună sunt cele mediate umoral, reprezentate de către moleculele de imunoglobulină cu funcţie de anticorpi, iar împotriva celor adaptate la viaţa intracelulară sunt cele ale imunităţii mediate celular, cum ar fi macrofagele, limfocitele citotoxice etc. Desigur, nu există graniţe rigide între aceste două modalităţi de apărare imună, un exemplu în acest sens fiind citotoxicitatea mediată celular anticorp-dependentă (ADCC) în care celula ucigaşă *K* atacă şi ucide celulele ţintă infectate sau denaturate, numai în condiţiile în care pe suprafaţa lor s-au fixat specific un anumit număr de molecule de anticorp.

Din cele expuse rezultă că între organismul gazdă şi agentul infectant există o gamă largă de influenţe, fiecare dintre aceşti doi parteneri căutând să câştige avantaje faţă de adversar. În final, în majoritatea cazurilor, organismul, mobilizându-şi tot arsenalul mijloacelor sale de apărare, reuşeşte să elimine agresorii microbieni.

Rezistenţa organismului faţă de diverşi agenţi infecţioşi poate fi înnăscută (naturală, nespecifică), situaţie în care este efectuată de către diverse mijloace nespecifice de apărare, sau dobândită (imună, specifică), efectuată de către moleculele sau/şi celulele sistemului imun care recunosc şi elimină specific agentul infecţios.

Imunitatea specifică poate fi dobândită activ, ca urmare a activării şi multiplicării efectorilor sistemului imun direct de către antigen, sau pasiv, prin transferul de imunoglobuline sau celulele limfoide de la un organism imunizat la altul neimunizat.

## MIJLOACELE NATURALE NESPECIFICE DE APĂRARE

Acestea formează "primele linii" de protecţie antivirală sau bacteriană. Unele dintre ele intervin în faza iniţială a contactului dintre agentul infecţios şi organism, opunându-se pătrunderii agentului în intimitatea ţesuturilor gazdei, iar altele intervin după ce acesta a traversat barierele cutanate şi a pătruns în ţesuturi.

**Mijloace de apărare cu rol de blocare a pătrunderii agenţilor infecţioşi în organism.** Dintre cele mai eficiente sunt pielea, mucoasele, mişcările cililor, peristaltismul intestinal, unele reflexe care declanşează tusea, strănutul etc.

Pielea şi mucoasele alcătuiesc o barieră mecanică impenetrabilă pentru microorganismele din mediul extern (cu excepţia unora dintre ele, cum ar fi de pildă stafilococii care o pot traversa). Graţie secreţiilor glandelor sudoripare şi sebacee bogate în acizi graşi, acizi lactici etc., la nivelul ei se realizează condiţii improprii de viaţă pentru bacterii, sporindu-i în acest fel funcţiile protectoare. Mişcările cililor, peristaltismul intestinal, tusea, strănutul etc. favorizează eliminarea mecanică a germenilor. Tot eliminare mecanică realizează şi mucozităţile de pe unele suprafeţe care, pe lângă funcţia strict fizică, pot în unele cazuri să competiţioneze cu receptorii pentru virioni de pe membrana celulelor stratului pavimentos, blocându-le posibilitatea de ataşare la celule, condiţie primordială pentru realizarea infecţiei. De altfel, absenţa receptorilor pentru virus pe membrana celulelor eucariote ale

unor specii de animale reprezintă un caracter genetic important în conferirea rezistenţei nespecifice a organismului faţă de unele microorganisme. De exemplu, absenţa de receptori pentru virusurile leucozelor aviare conferă rezistenţă unor rase de păsări, în timp ce alte rase, la care celulele au bine exprimaţi pe membrană receptorii, sunt extrem de susceptibile la această boală. O situaţie similară condiţionează şi expresia clinică a bolii lui Marek unde lipsa unor subpopulaţii de limfocite *T*, capabile să "găzduiască" virusul, face unele rase de găini indiferente la acest agent.

**Mijloace nespecifice de apărare, care intervin după ce agresorul a traversat barierele mecanice;** pot fi încadrate în două grupe diferite de factori, şi anume: *1)* factori umorali; *2)* factori celulari. Aceşti factori "cooperează" între ei şi se condiţionează reciproc, contribuind la realizarea unui microclimat nefavorabil multiplicării sau prezenţei agenţilor infecţioşi, realizat prin mecanisme diferite cum ar fi, de pildă, ridicarea temperaturii corporale peste limitele fiziologice ale virusurilor sau bacteriilor patogene, stocarea $Fe^{2+}$ în celulele şi ţesuturile organismului, făcându-l în acest mod inaccesibil bacteriilor, care pentru multiplicare au nevoie de cantităţi mari de ioni de Fe etc.

*Factorii umorali* acţionează local sau sistemic (general). Dintre cei cu acţiunea locală, un rol important revine lizozimului (care acţionează şi ca factor "antipenetrant", găsindu-se în unele secreţii care spală mucoasele), prezent în ţesuturi, în albuşul de ou etc. Lizozimul este o mucopeptidază capabilă să provoace liza bacteriilor, cărora le scindează mucopeptidele de la nivelul peretelui celular.

În cazul mucoaselor, un factor protector care nu întotdeauna acţionează strict specific îl reprezintă şi moleculele de IgA secretor, capabile să blocheze unele particule virale înrudite antigenic.

Dacă agresorii au reuşit să depăşească apărarea locală şi să invadeze organismul, atunci intervin prompt mijloacele defensive celulare şi umorale cu acţiune nespecifică. Dintre cele umorale, care acţionează nespecific şi "sistemic", mai importante sunt:

*a.* Properdina din sânge care, în prezenţa fracţiunii *C*3 a complementului şi a $Mg^{2+}$, dobândeşte remarcabile proprietăţi antiseptice.

*b.* Enzimele lizozomale (fosfataze acide, *B*-glicuronidaza, arilsulfataza etc.), eliberate din lizozim sub influenţa endotoxinelor germenilor Gram-negativi.

*c.* "Proteinele de fază acută" de genul ceruloplasminei, sintetizate şi eliberate în cantităţi mari, ca urmare a infecţiilor sau leziunilor tisulare provocate de diverşi agenţi infecţioşi. La păsări, de pildă, micoplasmele sau unele enterobacterioze induc eliberarea de ceruloplasmină din ţesutul hepatic cu activitate histaminică. Pe de o parte, ceruloplasmina se leagă la peretele bacteriilor bogate în fosforilcolină, formând un complex care poate activa complementul pe cale alternativă şi poate liza bacteria, iar pe de altă parte, conferă păsărilor rezistenţă la efectele endotoxinelor bacteriene, datorită proprietăţilor sale histaminazice.

*d.* Sistemul interferon sau interferonii ($\alpha$ sau leucocitar, $\beta$ sau fibroblastic şi $\gamma$ sau limfocitar) deţin un rol important în apărarea nespecifică antivirală prin inhibiţia replicării intracelulare a acestora. Sinteza lor poate fi generată de infecţii virale sau de inductori nevirali de genul acidului poliinozilic-policitidilic (poli I:C). Modul de acţiune al interferonilor (IFN) este complex şi încă insuficient cunoscut, ei putând influenţa atât particula virală aflată intra- sau extracelular, cât şi celula ţintă. Astfel, ei pot activa funcţiile citotoxice ale celulelor *NK* care, la rândul lor, vor distruge celulele infectate viral. Se leagă la receptorii gangliozidici de pe celule, declanşând sinteza unor proteine ribozomale de legare, capabile să blocheze translaţia ARN viral, dar nu şi pe cea a ARN celular; inhibă metabolismul celulei infectate şi deci

"viaţa gazdei", influenţează conţinutul în lipide al membranei celulare şi, ca atare, modifică întreaga activitate biologică dependentă de membrană, inclusiv exprimarea receptorilor pentru virus; au activitate antineoplazică etc.

e. Sistemul complement realizează apărarea anti-infecţioasă pe două căi diferite, şi anume: prin activarea funcţiilor fagocitare ale macrofagelor şi granulocitelor PMN, şi prin liza bacteriilor sau a celulelor infectate.

În prima situaţie, celulele fagocitare activate de către complement devin capabile să reţină şi chiar să înglobeze agenţii străini de organism atunci când aceştia au format complexe cu anticorpii şi cu unele fracţiuni ale complementului şi care, la rândul lor s-au fixat la receptorii pentru complement de pe membrana celulei. În cea de a doua situaţie complementul, activat pe cale clasică de către complexul antigen-anticorp sau pe cale alternativă de către diverşi activatori de genul endotoxinelor, LPS etc., devine bacteriolitic sau citolitic.

Lipsa totală sau sărăcia în unele componente ale complementului face ca, la unele specii de animale, activarea pe cale clasică să devină practic imposibilă, rolul primordial revenind activării pe cale alternativă. Este cazul şoarecilor săraci în componenta *C*5, sau al păsărilor, lipsite de *C*2 şi *C*4. O bogată activitate complementară, cum este cazul la cobai sau nurcă, ar fi după unii autori cauza rezistenţei acestor specii faţă de tumori. Într-adevăr, se pare că atât cobaii cât şi nurcile nu fac tumori spontane.

Sistemul complement odată activat, în afară de stimularea fagocitozei şi de citoliză sau bacterioliză, participă şi la procesele inflamatorii antibacteriene, stimulând deplasarea granulocitelor PMN, permeabilitatea vasculară etc.

*Efectorii celulari ai apărării naturale nespecifice.* Ca şi cei umorali, reprezintă "mecanisme primitive" de apărare formate în timpul evoluţiei filogenetice şi realizate de către celule cu funcţii fagocitare sau nefagocitare. Este cazul granulocitelor PMN capabile de fagocitoză activă cu distrugerea integrală a materialului fagocitat datorită bogatului conţinut de enzime lizozomale, al macrofagelor care degradează "parţial" şi selectiv, reţinând doar determinanţii antigenici, al bazofilelor şi mastocitelor cu rol fagocitar minor sau chiar absent dar eliberatoare active de mediatori implicaţi în iniţierea inflamaţiei şi facilitarea migrării PMN către locul inflamaţiei etc.

La mamifere, dar nu şi la păsări, granulocitele eozinofile proliferează în infecţiile cu helminţi, în unele boli infecţioase, în reacţii alergice etc. La păsări, echivalentul PMN de la mamifere este "leucocitul neutrofil", celulă dominantă în reacţiile inflamatorii acute, cu un conţinut bogat în fosfatază acidă şi $\beta$-glicuronidază, dar sărace în fosfatază alcalină şi peroxidază. La aceste vieţuitoare, principalele celule fagocitare sunt trombocitele, abundente în circulaţie (aproximativ de trei ori mai numeroase decât toate celulele fagocitare), cu citoplasmă bogată în granule de fosfatază acidă şi incluziuni lizozomale, dar lipsite de receptori de membrană pentru fracţiunile complementului.

## MIJLOACE DOBÂNDITE (IMUNE) DE APĂRARE SPECIFICĂ

Sunt moleculele de imunoglobulină cu funcţie de anticorpi şi diferitele tipuri de celule efectoare care intervin direct în neutralizarea agresorului. Anticorpii sunt efectorii "imunităţii mediate umoral", iar diferitele celule ale sistemului imun, cum ar fi limfocitele *T* citotoxice, celulele *NK, K,* macrofagele, sunt efectoarele "imunităţii meditate celular".

**Imunitatea mediată umoral.** Anticorpii, sintetizaţi de către limfocitele *B* stimulate de antigen şi ajutate de celulele prezentatoare de antigen şi de limfocitele *T* ajutătoare, apar în secvenţă cunoscută, primii formaţi fiind cei din clasa IgM şi ulterior cei din clasa IgG, IgA etc. Ei realizează apărarea organismului singuri sau în cooperare cu alţi mediatori solubili (complementul, diferite alte citokine) sau efectori celulari (macrofage, PMN etc.) cărora le activează funcţiile fagocitare sau citotoxice, facilitând legarea complexelor antigen-anticorp la receptorii *Fc* sau la receptorii pentru complement de pe membrana acestor celule, sau funcţiile citotoxice mediate celular anticorp-dependente (ADCC). Anticorpii,din clasa IgG în special,participă la protecţia embrionilor, fiind transferaţi pasiv de la mamă la fetus, transplacentar în cazul mamiferelor, sau transovular la păsări, la care embrionul primeşte în exclusivitate anticorpi IgG începând cu ziua a 11-a de viaţă embrionară, transferul masiv având loc în momentul ecloziunii. Rolul anticorpilor este esenţial în protejarea faţă de unele microorganisme sau molecule străine, cum ar fi toxinele bacteriene, virusurile şi bacteriile extracelulare, infecţiile cu micoplasme, chlamidii etc., dar este minor faţă de altele, cum ar fi virusurile leucozei bovine, al laringotraheitei la păsări, infecţiile cu germeni Gram-negativi etc. Practic, punerea în evidenţă a contribuţiei lor la apărarea imună a organismului se realizează fie prin administrarea pasivă de seruri imune (seroterapie), fie prin bursectomie la păsări, vertebrate la care bursa lui Fabricius este organul limfoid central de educare a limfocitelor *B* precursoare ale celulelor secretoare de anticorpi (plasmocite). În cazul în care protecţia este conferită exclusiv sau predominant de către anticorpi, după bursectomie se constată o scădere sau chiar anularea rezistenţei la boala respectivă. De fapt, prin ablaţia organelor limfoide centrale - timus sau bursa lui Fabricius - poate fi evidenţiată cota de participare a efectorilor umorali sau celulari la apărarea imună. De exemplu, rezistenţa păsărilor faţă de boala Newcastle scade de 100 de ori după timectomie şi de 1 000 000 de ori după bursectomie, fapt care ilustrează elocvent importanţa imunităţii mediate umoral în această boală.

*Rolul anticorpilor în apărarea imună antivirală.* Virusurile pot fi neutralizate de către anticorpi în două maniere diferite, şi anume:

a) prin acţiune directă asupra particulei virale în momentul în care aceasta părăseşte celula şi ajunge în circulaţie, deci când virusul este infectant, situaţie în care sunt foarte eficienţi în prevenirea reinfecţiilor;

b) prin acţiunile exercitate asupra celulei infectate viral pe care se fixează specific prin *Fab*, favorizând activarea complementului sau funcţiilor citotoxice ale celulelor *K,* efectoare ale ADCC.

Numai unii determinanţi antigenici de pe suprafaţa particulei virale sunt recunoscuţi specific de către anticorpi. De aceea, moleculele de imunoglobulină care recunosc pe cei "esenţiali" vor fi mai eficace în inhibiţia proliferării şi diseminării virale în comparaţie cu cele care recunosc determinanţii neesenţiali.

Dar, în anumite situaţii, anticorpii pot avea şi efecte negative. De exemplu, în absenţa complementului pot "masca" antigenul viral exprimat pe suprafaţa celulei infectate, blocând în acest fel activitatea distructivă a celulelor efectoare ale citotoxicităţii naturale mediate celular *(NK),* a limfocitelor *Tc* etc. De asemenea, în concentraţii mari inhibă activitatea limfocitelor *K*, efectoare ale ADCC.

*Rolul anticorpilor în infecţiile bacteriene* este condiţionat de clasa căreia îi aparţin. Astfel, activitatea bactericidă opsonizantă şi aglutinantă revine predominant anticorpilor din clasa IgM, iar cea precipitantă celor din clasa IgG. Ca atare, moleculele IgM aglutinează bacteriile imobilizându-le, activează complementul care va liza peretele bacteriilor,facilitează captarea acestora de către celulele

fagocitare etc. Moleculele IgG difuzează rapid în tot organismul (inclusiv în fetus pe cale transplacentară) şi neutralizează toxinele sau corpii bacterieni. Anticorpii IgA secretori, cu o rezistenţă particulară la acţiunea distructivă a enzimelor, reprezintă o importantă linie de apărare antibacteriană de la nivelul mucoasei intestinale, deşi unele tulpini bacteriene pot elibera proteaze capabile să descompună moleculele IgA.

Anticorpii pot funcţiona asupra bacteriilor în diferite modalităţi (fig. 200), dintre care cele mai importante sunt:

*a.* Imobilizarea germenilor ciliaţi sau flagelaţi. Această modalitate de acţiune, realizată în principal de către anticorpii din clasa IgM, dar care poate fi efectuată şi de către alte clase de imunoglobuline, se dovedeşte eficientă în frânarea virulenţei unor germeni Gram-negativi ciliaţi sau flagelaţi, cum ar fi cei din speciile *Proteus, Escherichia coli* etc.

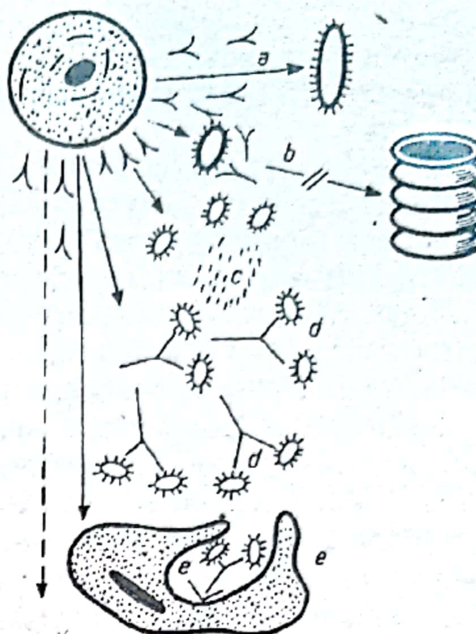


Fig.200. Modalităţi diferite de neutralizare a bacteriilor de către anticorpi.

a - imobilizarea germenilor ciliaţi; b - inhibiţia ataşării lor la seroase sau mucoase; c - liza bacteriilor dependentă de complement; d - formarea de complexe anticorp-bacterie; e - fagocitoza opsonică a complexelor bacterie-anticorp.

*b.* Inhibiţia aderenţei la seroase sau mucoase. Unii germeni, în special cei cu localizare digestivă, aderă iniţial la mucoasa intestinului, unde formează microcolonii. Pentru realizarea aderenţei, care constituie o condiţie esenţială pentru invazie, bacteria posedă la nivelul peretelui celular nişte componente proteice - adezine - care nu sunt altceva decât nişte liganzi prin intermediul cărora celula se ataşează la mucoasa intestinală. Anticorpii, în special cei din clasa IgA, blochează adezinele şi fac imposibile aderarea şi accesul bacteriilor la ţesuturi, blocând în acest fel posibilitatea lor de invazie.

*c.* Opsonizarea este un mijloc important de apărare antibacteriană. Se ştie că primul moment important în apărarea imună îl constituie fagocitarea agresorului şi eliminarea sa concomitent cu prezentarea determinanţilor antigenici limfocitelor, în vederea declanşării cascadei de reacţii imune specifice. Unele bacterii însă sunt înzestrate cu mijloace care le protejează de acţiunea fagocitară a macrofagelor: este cazul capsulei, al proprietăţilor hidrofile ale peretelui celular, al polizaharidelor capsulare, al proteinei M(la streptococi), al antigenelor O, al microvililor etc. Toţi aceşti factori inhibă ataşarea bacteriei la membrana celulei fagocitare şi, în consecinţă, inhibă fagocitoza. Celulele fagocitare pot totuşi depăşi aceste impedimente. Receptorii *Fc* şi receptorii pentru fracţiunile *C* 3 sau *C* 4 ale complementului pot facilita ataşarea bacteriilor la membrana celulei fagocitare. Această ataşare se face prin intermediul fragmentului *Fc* al moleculelor de anticorp care s-au fixat pe bacterie, sau prin fracţiunile *C* 3 sau *C* 4 ale complementului legat la complexul anticorp-bacterie. În primul caz, complexul anticorp-bacterie se fixează la receptorul *Fc* de pe membrana macrofagului, iar în cel de al doilea caz, la receptorul pentru complement de pe suprafaţa aceleiaşi celule. Se pare că, în cazul ataşării la membrană a complexului bacterie-anticorp-complement la receptorul pentru complement, fagocitoza nu are loc, bacteria fiind doar "reţinută" la peretele macrofagului. Opsonizarea poate avea loc şi în absenţa

anticorpilor care recunosc specific bacteriile. Aceasta se realizează fie prin activarea complementului pe cale alternativă, fie prin agregate moleculare de imuno-globulină fără funcţii specifice pentru determinanţii antigenici ai bacteriei respective.

*d.* Bacterioliza dependentă de complement se instalează numai în condiţiile formării complexelor anticorp-bacterie. Susceptibile la liză sunt formele *S* ale germenilor Gram-negativi. Formele *R* sunt mai rezistente, iar germenii Gram-pozitivi sunt practic rezistenţi. Mai eficienţi în activarea complementului sunt anticorpii IgM, deşi această activare poate fi realizată şi de către anticorpii IgG, cu condiţia ca spaţiul dintre două molecule IgG, respectiv dintre fragmentele lor *Fc*, să fie foarte mic. În fazele timpurii ale infecţiei, anticorpii IgM şi eventual şi IgA ar juca un rol preventiv important, acţionând ca anticorpi naturali capabili să activeze complementul care va liza celula bacteriană.

Cu toate acestea, bacterioliza prin complement nu pare să fie un mijloc important de apărare antibacteriană. Ca dovadă, animalele lipsite de unele fracţiuni ale complementului, sau în cazuri de deficite congenitale care afectează unele sau altele dintre fracţiunile acestui sistem, nu înregistrează o incidenţă crescută a infecţiilor.

*e.* Neutralizarea toxinelor bacteriene este realizată aproape exclusiv de către anticorpii din clasa IgG, constituind un mijloc important de apărare cu precădere faţă de germenii toxigeni.

**Imunitatea mediată celular.** Apărarea imună mediată celular, specifică, efectuată de către limfocitele *Tc* sau de către celulele *K* (efectoare ale ADCC), ori selectivă, realizată de către celulele *NK* (efectoare ale citotoxicităţii naturale mediate celular), constituie un arsenal complex şi de importanţă majoră în protecţia faţă de virusuri (fig. 201).

La diferite specii de animale s-a demonstrat că activarea funcţiilor citotoxice ale acestor celule şi în special a limfocitelor *Tc* şi a celor *NK* este urmată de instalarea unei rezistenţe solide faţă de infecţii. În organismul imunizat sau stimulat nespecific, virusul nu se mai poate multiplica, deoarece celula gazdă este distrusă în cursul replicării virionilor sau în momentul în care determinanţii antigenici virali sunt exprimaţi pe suprafaţa ei. De exemplu, în boala lui Marek la păsări, suprimarea multiplicării virale şi eliminarea celulelor infectate este realizată predominant prin mijloacele imunităţii mediate celular.

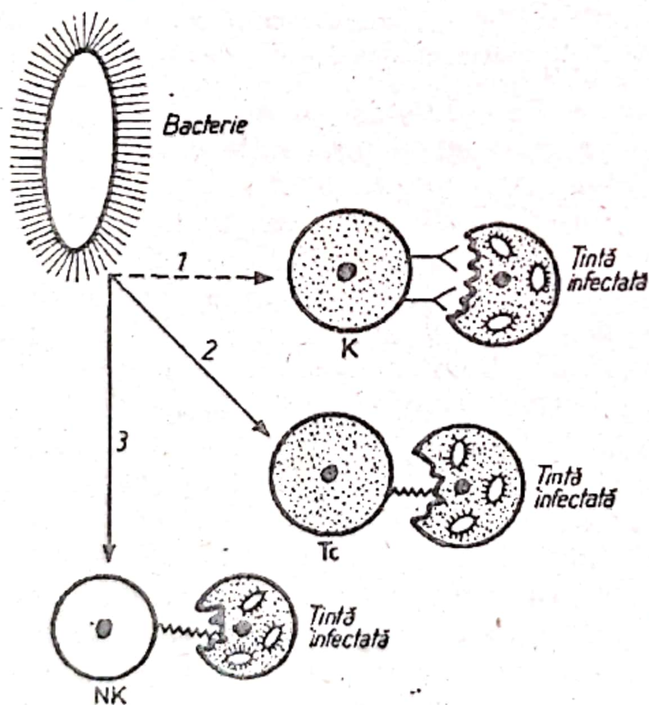



Fig.201. Unele modalităţi de apărare imună antibacteriană, mediată:

1. Prin citotoxicitate anticorp-dependentă (ADCC);
2. Prin citoliză efectuată de către limfocitele T citotoxice (Tc);
3. Prin celule NK.

De regulă, celulele efectoare ale citotoxicităţii distrug celulele infectate cu bacterii şi nu bacteriile propriu-zise.

Ca şi în cazul reacţiilor faţă de alţi agresori, reacţiile imune antivirale se află sub restricţia complexului major de histocompatibilitate (MHC), în sensul că limfocitele *T* recunosc numai acele celule infectate viral cu care sunt identice sub raport MHC.

Se pare că susceptibilitatea la infecţii virale este asociată cu disfuncţii ale limfocitelor *T*, prezenţa acestor celule fiind necesară atât pentru asigurarea transmiterii mesajelor în vederea sintezei de anticorpi antivirali, cât şi pentru realizarea apărării imune mediate celular. De exemplu, virusul cito-megalic este patogen numai pentru şoarecii iradiaţi letal, la care au fost distruse sau alterate profund limfocitele *Tc* ($CD8^+$). Şoarecii *Nu/Nu* lipsiţi de limfocitele *T* mor în urma infecţiei cu virusul vaccinal, dar rezistă dacă li se inoculează o limfokină sintetizată de către celulele *T* activate (IL-2). De aici concluzia că limfocitele *T* pot acţiona direct, ca de altfel şi alte celule, asupra celulelor infectate viral pe care le lizează, dar pot acţiona şi prin eliberarea de citokine care blochează replicarea virionilor. De pildă, IFN$\gamma$ este un blocant al replicării virale care, în asociere cu IFN$\beta$, amplifică mult activitatea TNF$\alpha$ (tabelul 108).

*Tabelul 108*

**Unele modalităţi de acţiune antivirală a trei citokine**

| Citokina | Mod de acţiune |
|---|---|
| IL-2 | - Emite semnale chemotactice şi activatoare pentru celulele *T*, *NK* etc. care vor acţiona antiviral<br>- Reglează sinteza de IFN$\gamma$ de către limfocitele *T* |
| IFN$\gamma$ | - Poate acţiona direct asupra virionilor, inhibându-le replicarea<br>- Induce rezistenţă faţă de virus ("stare antivirală") celulelor învecinate cu celula infectată<br>- Acţionează antiviral sinergic cu TNF$\alpha$ |
| TNF$\alpha$ | - Acţionează antiviral sinergic cu IFN$\gamma$<br>- Realizează supresia directă a replicării virale<br>-Activează eliberarea radicalilor liberi de oxigen, care vor "arde" celulele infectate |

Virusul herpetic, inoculat la şoarecii normali, rămâne un timp cantonat la locul de inoculare, după care dispare. Dacă, însă, se instalează deliberat o depresie a funcţiilor imune, virusul difuzează în tot organismul, ca urmare a blocării funcţionale a macrofagelor şi a celulelor *Tc*. Oamenii aparent sănătoşi sunt purtători ai acestui virus fără a avea manifestări clinice locale sau generale (vezicule, pustule, ulceraţii, febră etc.). În caz de stres sau după diferite agresiuni imuno-depresoare, apar leziunile cutanate, uneori pe suprafeţe întinse şi cu localizări diferite, care pot să dispară şi să reapară; alternanţa dintre puseele acute şi perioadele de remisiune este condiţionată de capacitatea de apărare imună mediată celular.

Mecanismele apărării faţă de bacterii sunt similare celor care intervin în apărarea antivirală, celulele efectoare fiind cele cu funcţii fagocitare (monocite, macrofage etc.), citotoxice (*Tc*, *NK*, *K*), de hipersensibilitate de tip întârziat (*Td*) etc. De exemplu, limfocitele *Tc* ($CD8^+$) au rol major în ce priveşte asigurarea

rezistenţei la infecţia cu *Listeria monocytogenes* şi formarea granuloamelor, iar cele *Th* ($CD4^+$) sunt implicate în dezvoltarea hipersensibilităţii de tip întârziat. De altfel, limfocitele $CD8^+$ sunt esenţiale în realizarea protecţiei faţă de bacteriile cu localizare intracelulară. Dar, uneori, ele pot contribui la diseminarea lor în organism datorită spargerii nişelor celulare în care acestea sunt găzduite. Această diseminare se produce mai ales atunci când titrul anticorpilor din circulaţie este redus. În asemenea condiţii, agenţii patogeni nu sunt neutralizaţi imediat ce au ajuns extracelular, putând pătrunde în alte celule. Acest fenomen se observă şi în cazul infecţiilor virale, nu numai în cele cu etiologie bacteriană, constituind încă o dovadă a necesităţii cooperării tuturor mecanismelor de apărare imună pentru realizarea unei neutralizări prompte şi eficiente a agresorilor.

În cazul bacteriilor cu localizare extracelulară, un rol defensiv important revine celulelor fagocitare care, pe lângă fagocitoză (pinocitoză), trebuie să denatureze sau să ucidă rapid materialul înglobat, ucidere care, de regulă, este mai rapidă la bacteriile nepatogene decât la cele patogene. Unele dintre ele, cum ar fi mycobacteriile, chiar dacă sunt fagocitate, nu sunt atacate şi descompuse de către enzimele lizozomale ale celulelor fagocitare. Ele inhibă procesul de fuzionare a lizozomilor cu fagozomii, făcând imposibilă intrarea în acţiune a enzimelor bacteriolitice. Altele, cum ar fi *Brucella abortus, Mycobacterium avium* etc., sunt rezistente la acţiunea enzimelor lizozomale, putând persista timp îndelungat în fagozomi pe care, în cele din urmă, îi distrug. În astfel de situaţii, fagocitarea lor prin opsonizare este un mijloc ineficient de apărare deoarece, de regulă, după fagocitare este omorâtă celula fagocitantă şi nu bacteria. Dar, prin diverse mecanisme mediate celular, macrofagele sunt activate de unele limfokine, eliberate în special la limfocitele *T*, cum ar fi MAF (factorul de activare a macrofagelor), MIF (factorul de inhibiţie a migrării macrofagelor), MAgF (factorul de agregare a macrofagelor) etc., limfokine care conferă acestor celule proprietăţi citotoxice şi bactericide sporite. Limfokinele influenţează funcţiile fagocitare şi secretorii ale macrofagelor, capacitatea de migrare a lor etc., reţinându-le la locul infecţiei. Aceste macrofage, astfel influenţate, capătă o agresivitate antibacteriană crescută şi o capacitate sporită de recunoaştere şi liză a celulelor propriului organism. La rândul lor, macrofagele au un important rol în declanşarea şi controlul reacţiilor celulare care vor activa limfocitele *B* în vederea sintezei de anticorpi, în activarea funcţională a limfocitelor *Tc*, care vor distruge eficient şi specific celulele infectate etc. De asemenea, un rol important în apărarea antibacteriană revine şi celulelor *NK* şi *K*.

Rezultă, deci, că sistemul imun dispune de mecanisme şi strategii simple, puţin evoluate în cursul filogeniei, şi de strategii "sofisticate", care se opun penetrării şi multiplicării agenţilor infecţioşi în organism. Aceste mecanisme şi strategii intervin într-un mod condiţionat de natura agenţilor infecţioşi implicaţi - virusuri, bacterii, fungi, paraziţi - precum şi de localizarea şi modul lor de viaţă parazitară - intracelular, extracelular etc.

Iniţial intră în acţiune mijloacele de apărare nespecifică, de pildă barierele cutanate, diferitele molecule aflate în circulaţie, celulele fagocitare etc., pentru ca ulterior, în cazul în care "prima linie de apărare" a fost străpunsă, să intre în funcţie arsenalul mijloacelor specifice, respectiv efectoarele moleculare şi celulare (anticorpi, limfocite, *Tc* etc.). Barierele cutanate se găsesc în permanenţă în stare de alertă, din care cauză, de regulă, sunt greu de depăşit de către virusuri sau bacterii, cu condiţia să fie în perfectă stare de integritate. Orice "soluţie de continuitate" provocată în structura lor, ca de pildă secţionări, rupturi, arsuri etc., sunt tot atâtea porţi larg deschise pentru invazia microbiană. Pielea şi mucoasele

normale, fie că este vorba de epiteliul intestinal sau de cel bronşic, sunt în permanenţă descuamate pentru a se elimina bacteriile ataşate la suprafaţa lor. Mişcările peristaltice ale intestinului, cilii, secreţiile favorizează această eliminare. Mucozităţile, pe lângă îndepărtarea mecanică a microorganismelor, au şi acţiune bactericidă exercitată prin intermediul lizozimului, enzimelor proteolitice, glicolipidelor salivare, sau diferitelor săruri care intră în componenţa lor. Epiteliile unor organe sunt practic inaccesibile pentru majoritatea microorganismelor: este cazul mucoasei gastrice care, datorită *p*H-ului foarte scăzut, creează condiţii total improprii dezvoltării florei bacteriene (poate cu excepţia speciei *Campylobacter jejuni* ).

În ciuda existenţei acestor factori de apărare nespecifică, ei pot fi uneori depăşiţi de agresori, dar în spatele lor se găseşte amplasată "a doua linie de apărare": celulele fagocitare şi diferitele citokine care preced apărarea specifică formată din celulele prezentatoare de antigen şi limfocitele organizate în "aglomerări" celulare mai mult sau mai puţin compacte, asociate zonelor respective, sub formă de celule dispersate în epitelii, mucoase, plăci Peyer, ganglioni limfatici etc. La aceste nivele au loc recunoaşterea specifică a agresorilor, captarea şi prelucrarea lor, urmate de instalarea cooperărilor celulare între limfocitele *T* şi *B*, proliferarea clonală sau policlonală a acestora, ca de pildă proliferarea limfocitelor în centrii germinativi şi foliculari limfoizi etc. De exemplu, limfocitele *B* stimulate antigenic la nivelul intestinului proliferează în foliculii limfoizi, după care migrează în tot organismul sub formă de celule de memorie, realizând generalizarea universală la nivelul organismului a informaţiilor privind natura agresorului. La nivelul formaţiilor limfoide asociate intestinului, cooperarea se face în interiorul plăcilor Peyer, iar plasmocitele ajunse în centrii germinativi ai foliculilor vor sintetiza anticorpi anti-antigene flagelare (*H*) sau somatice (*O*) bacteriene, anticorpi neutralizanţi pentru diferite toxine, anticorpi anti-adezine bacteriene etc. Celulele care migrează traversează ganglionii limfatici mezenterici, ajung în ductul toracic limfatic, iar de acolo prin vene şi artere se răspândesc în tot organismul, pentru a se localiza în cele din urmă în *lamina propria* sau în alte locuri de elecţie, ca de exemplu, mucoasele bronhiilor, ale glandelor salivare, lacrimale etc., unde vor sintetiza IgE. În acelaşi timp, circulaţia vasculară a limfocitelor *B* şi *T* sensibilitate la nivelul plăcilor Peyer sau al formaţiunilor limfoide locale asigură informaţional întregul sistem imun.

În *lamina propria* a mucoaselor, moleculele de IgA dimer fixează componenta secretorie produsă de către celulele epiteliale, după care sunt transportate la suprafaţa mucoaselor sub formă de IgA secretor care, datorită proprietăţilor lui aglutinante, inhibă absorbţia agenţilor infecţioşi pe suprafaţa epiteliilor, blocându-le astfel posibilitatea de penetrare. Acest tip de răspuns este activat prin vaccinări orale ca, de pildă, prin vaccinul oral antipoliomielitic care induce o sinteză abundentă de anticorpi IgA secretori.

Dacă, totuşi, agresorii au străbătut şi această linie de apărare, atunci vor avea de înfruntat atacul specific al anticorpilor, liza dependentă de complement, fagocitoza opsonică, intervenţia unor citokine de genul IL-1, IL-6, TNF, care provoacă procese inflamatorii locale şi "disconfort" etc. Chiar dacă rămân "ascunşi" în interiorul celulelor parazitate, nu pot evita acţiunea citotoxică a celulelor *NK* sau *Tc*. În concluzie, apărarea imună antivirală şi antibacteriană se realizează printr-un complex de mijloace înnăscute sau dobândite care intră în acţiune în diferite momente ale agresiunii. De regulă, intervenţia conjugată a tuturor acestor mijloace sfârşeşte prin a elimina agresorul şi a restitui armonia funcţională a organismului.

Dar, aceste strategii ale mecanismelor de apărare imună antiinfecţioasă au şi unele limite care pot fi generate de intervenţia unor factori intrinseci sau extrinseci organismului. Din prima categorie trebuie menţionată "moştenirea genetică" a acestuia, iar din a doua multitudinea de factori de mediu neinfecţioşi ca, de exemplu, iradierile, intoxicaţiile cronice sau acute, diferite agresionări stresante, sau agenţi infecţioşi, cum ar fi virusul imunodeficienţei dobândite (HIV), care alterează profund capacitatea de apărare a organismului. Deficitele funcţiilor fagocitare de sinteză a imunoglobulinelor şi în special dereglările lor funcţionale sunt principalii factori responsabili de instalarea unor infecţii cronice virale sau bacteriene. De exemplu, unele persoane contractează infecţii stafilococice cronice dispersate sub formă de abcese sau furunculi de diferite dimensiuni pe toată suprafaţa corpului sau localizate pe anumite regiuni ale acestuia, în special pe faţă sau pe spate. În ciuda intervenţiilor terapeutice locale şi generale, care apelează la mijloace complexe începând cu antibioticele, şi terminând cu vaccinuri, autovaccinuri, anatoxine stafilococice, boala poate evolua cronic ani de zile. Cauza majoră a acestei "impotenţe" a apărării imune este, printre altele, dereglarea raportului normal existent în populaţia limfocitară *T*, manifestată prin creşterea procentului de limfocite *T*s (*CD*8$^+$) şi activarea funcţională a acestora. La această dereglare se poate asocia şi o redusă activitate secretorie a macrofagelor şi monocitelor, cu referire specială la sinteza şi secreţia de IL-1 şi eventual de TNF, precum şi scăderea potenţialului lor fagocitar. Terapia imunomodulatoare cu Cantastim, care readuce funcţiile şi rapoartele intercelulare în limite normale, asociată cu stimularea clonală specifică cu autovaccin stafilococic rezolvă problemele într-un timp record.

Deficitele imunităţii mediate celular pot fi responsabile de infecţiile oportuniste, un exemplu devenit de acum "clasic" fiind sarcomul Kaposi în infecţiile cu HIV. În unele situaţii, răspunsul imun este responsabil de instalarea unor stări patologice, cum este cazul complexelor imune circulante care pot genera stări de hipersensibilitate, sau al unor anticorpi care pot provoca leziuni organice autoimune, de genul endocarditelor, consecutiv infecţiilor stafilococice. Dar, acestea sunt excepţii care este de dorit să fie cât mai rare.

În concluzie, apărarea imună antivirală şi antibacteriană se realizează printr-un complex de mijloace înnăscute sau dobândite, care intră în acţiune în diferite momente ale agresiunii. De regulă, intervenţia conjugată a tuturor acestor mijloace sfârşeşte prin a elimina agresorul şi a restabili armonia funcţională (homeostazia) a organismului.

## APĂRAREA IMUNĂ ÎN INFECŢIILE PARAZITARE

Mamiferele pot fi infectate cu diverse protozoare, trematode, nematode etc., care cantonează în diferite organe şi ţesuturi şi a căror prezenţă, în general, nu este incompatibilă cu viaţa gazdei, dar creează teren favorabil pentru infecţiile virale şi bacteriene. Paraziţii, atât în stadiul de dezvoltare larvară cât şi în stadiul adult, pot infecta o specie unică sau diverse animale aparţinând unor specii diferite. Prezenţa lor poate altera profund unele funcţii biologice sau poate produce doar un simplu disconfort la locul de cantonare. De regulă, au un ciclu de viaţă complicat şi un număr mare de determinanţi antigenici (epitopi) care pot fi exprimaţi doar într-un anumit stadiu de dezvoltare şi pe care-i pot modula foarte rapid, eliberându-i în cantităţi foarte mari în mediul înconjurător, de unde ajung în circulaţie.

răspândindu-se în tot organismul. Antigenele parazitare pot circula ca atare, stimulând reacţiile imune mediate umoral sau celular, sau sub formă de complexe antigen-anticorp.

Deci, organismul gazdă, chiar dacă aparent tolerează paraziţii, nu este total areactiv faţă de ei: îi recunoaşte ca străini dar nu-i poate îndepărta aşa cum face cu grefele de ţesuturi sau organe. Explicarea acestui fenomen particular de "toleranţă" aparentă încă nu a fost dată în mod satisfăcător. Este foarte posibil ca relaţiile dintre organismul invadat şi parazitul invadator, datorită "vechimii" lor în evoluţia filogenetică, să fi stabilit un "modus vivendi" care permite o convieţuire în care eficienţa mijloacelor de rejecţie este extrem de limitată.

## MECANISME PRIN CARE PARAZIŢII EVITĂ REACŢIILE DE APĂRARE ALE GAZDEI

În vederea perpetuării propriei lor specii, paraziţii evită atacurile gazdei recurgând la diverse mijloace de "fofilare", cum ar fi:

*a.* Alegerea locului optim de cantonare în organism. Unii paraziţi s-au adaptat vieţii intracelulare devenind inaccesibili mijloacelor de apărare mediate umoral (tabelul 109). Alţii, cum ar fi *Trichinella,* cisticercii, se înconjoară de structuri protectoare de genul unor capsule fibroase, membrane chistice etc. prin intermediul cărora se izolează aproape perfect de intervenţia distructivă a acestor mijloace. Alţii se izolează "funcţional", dispunând în acest scop de posibilităţi eficiente de blocare a enzimelor lizozomale, a aminelor vasoactive, radicalilor de oxigen de genul $O_2^{\cdot}$, $^1O_2$, $HO^{\bullet}$, $H_2O_2$ etc.

*Tabelul 109*

**Exemple de căi de "evadare" a paraziţilor de sub controlul imun al gazdei (după I.M. Roitt şi colab.)**

| Parazit | Habitat | Mijloace folosite de către organism pentru apărare | Mijloace de evitare a efectului distructiv al acestor mijloace |
|---|---|---|---|
| *Trypanosoma* | Torentul circulator | Liză prin anticorpi şi complement | Modulaţia antigenică |
| *Plasmodium* | Hematii | Anticorpi | Modulaţia antigenică<br>Localizare intracelulară |
| *Toxoplasma* | Macrofage | Enzime lizozomale<br>Metaboliţi | Inhibă fuziunea lizozomilor<br>Anulează metaboliţii $O_2$ |
| *Trichinella spiralis* | Muşchi, intestin, sânge | Eozinofile<br>Anticorpi+complement | Prin închistare |
| *Schistosoma mansoni* | Intestin, sânge, plămâni | Eozinofile<br>Anticorpi+complement | "Împrumută" antigenele gazdei<br>Este mascată de către complexe antigen+anticorp |

*b.* Modulaţia antigenică permite evitarea acţiunii anticorpilor sintetizaţi de către gazdă prin variaţii continue ale determinanţilor antigenici de suprafaţă, paraziţii prezentând la diferite intervale de timp o altă haină care, până să fie recunoscută ca "străină" de către sistemul imun, este înlocuită de către alta.

*c.* "Camuflarea" cu ajutorul antigenelor specifice gazdei. Unii paraziţi, cum ar fi *Schistosoma mansoni,* încorporează selectiv pe suprafaţa lor glicolipide cu specificitate antigenică proprie grupelor sangvine ale gazdei, prin intermediul cărora se "camuflează" perfect de mijloacele de apărare ale acesteia.

*d.* Inhibiţia funcţiilor de apărare a organismului. Numeroşi paraziţi eliberează factori limfocitotoxici solubili, care inhibă reacţiile imune. Imunosupresia indusă de către diverşi factori eliberaţi activ de către paraziţi, de larvele lor sau de către cantitatea masivă de antigene parazitare este nespecifică, ea afectând atât imunitatea celulară cât şi pe cea mediată umoral. Dar, infecţia parazitară poate induce şi o supresie specifică prin activarea limfocitelor *T* supresoare (*T*s) care vor inhiba, printre altele, reacţiile de hipersensibilitate de tip întârziat, sinteza de anticorpi, proliferarea policlonală a limfocitelor etc. În unele situaţii, această supresie specifică este totuşi salutară atât pentru parazit cât şi pentru gazdă, care nu mai este expusă acţiunii unor mecanisme violente de apărare de genul celor de hipersensibilitate de tip imediat sau întârziat, care i-ar perturba nespecific unele funcţii biologice importante.

Bineînţeles că şi în infecţiile parazitare intervin mijloace de apărare nespecifice sau specifice, ultimele fiind expresia unor cooperări celulare şi a unor mecanisme de reglare în mare parte încă insuficient cunoscute.

## MECANISME DE APĂRARE ANTIPARAZITARĂ FOLOSITE DE CĂTRE ORGANISMUL INFECTAT

În relaţia gazdă-parazit intervin procese complexe finalizate fie prin stabilirea unui echilibru, fie prin modificarea homeostaziei organismului cu alterarea gravă a funcţiilor sale fiziologice. În mare măsură, orientarea acestor procese spre o direcţie sau alta este influenţată de către sistemul imun, care în condiţii normale poate limita sau chiar anula invazia bacteriană ori, în caz de depresii, poate favoriza extinderea acesteia. Astfel, infecţiile parazitare care la animalele normale evoluează benign şi asimptomatic, la cele imunodepresate, consecutiv gestaţiei, carenţelor alimentare, timectomiei neonatale, tratamentelor cu ser antilimfocitar sau cu diverse citostatice, iradierilor letale etc., evoluează exploziv, interesând chiar şi organe care de regulă nu sunt infectate de către parazitul respectiv ("sindrom de hiperinfecţie"). În această ordine de idei, merită menţionată infecţia umană cu *Pneumocystis carinii* care, la pacienţii imunodepresaţi, cum ar fi sindromul de imunodeficienţă (AIDS) generat de către virusul HIV, are o evoluţie dramatică şi contribuie în mare măsură la grăbirea sfârşitului letal.

Toate acestea constituie dovada indiscutabilă a rolului care revine mijloacelor de apărare în instalarea şi evoluţia infecţiilor parazitare.

Dar, mecanismele de apărare, inclusiv cele imune, variază considerabil de la un parazit la altul, sau chiar de la o specie la alta, astfel că înţelegerea, stăpânirea şi dirijarea lor rămân încă un deziderat. Cu toate că studiul infecţiilor parazitare şi al biologiei paraziţilor a început cu mult înaintea studiului bacteriilor sau virusurilor, totuşi, imunoparazitologia este şi în prezent slab dezvoltată. Dintre motivele principale care au condiţionat această "întârziere" ar putea fi amintite următoarele:

*a*. dificultatea de cultivare *in vitro* a paraziţilor şi deci de obţinere de antigene parazitare la un înalt grad de puritate şi suficiente cantitativ.

*b*. Complexitatea ciclului de viaţă al paraziţilor, cu faze diferite de dezvoltare, caracterizate prin exprimarea de determinanţi antigenici diferiţi.

*c*. Modulaţia antigenică a paraziţilor.

*d*. Insuficienta cunoaştere a caracterelor lor genetice.

*e*. Complexitatea şi particularităţile formelor de apărare imună care intervin în infecţiile parazitare.

În comparaţie cu reacţiile de apărare antivirală sau bacteriană, cele antiparazitare au unele caracteristici distincte. Astfel, apărarea antiparazitară mobilizează un număr mai mare de mecanisme specifice sau nespecifice, mediate umoral sau celular, care controlează nu numai multiplicarea agenţilor infectanţi la locul de cantonare, dar şi diseminarea lor în organism. De exemplu, se pare că în malarie complicaţiile clinice ar fi datorate unor toxine, aşa că imunitatea în această parazitoză ar fi în parte antiparazitară şi în parte antitoxică. Febra şi alte semne ale bolii ar fi datorate unor "autotoxine" eliberate ca răspuns la "autotoxigeni" derivaţi din paraziţi. Încercările de vaccinare au folosit antigene recombinate destinate prevenirii primului stadiu al infecţiei sau un amestec de peptide obţinut din stadiile asexuate din sânge. În serul pacienţilor cu malarie se găsesc antigene termostabile eliberate de schizozomi după faza exoeritrocitară, care de fapt sunt nişte "toxine" care ar putea constitui materialul de bază al viitoarelor antigene.

Pe lângă mijloacele "clasice", în care intervin diferite celule efectoare, în acest gen de agresiune sunt masiv interesate granulocitele eozinofile, mastocitele, limfocitele *T* de hipersensibilitate de tip întârziat (*T*d) etc. Multe infecţii sunt asociate cu splenomegalii pronunţate, fapt care sugerează că antigenele parazitare acţionează ca activatori policlonali pentru limfocite. Unii paraziţi stimulează sinteza unor anumite clase de imunoglobuline. Astfel, unele protozoare care parazitează elementele figurate ale sângelui stimulează sinteza anticorpilor din clasa IgM, altele, a celor din clasa IgG, iar paraziţii intestinali, sinteza moleculelor IgE.

### Mecanisme nespecifice de apărare în parazitoze

În prezent, este evident faptul că susceptibilitatea sau rezistenţa gazdei faţă de parazit este sub controlul unor anumite gene care, probabil, că la speciile parazitate sunt recesive. O dovadă că este aşa o constituie modul de dezvoltare a unui parazit în gazde aparţinând unor specii rezistente. De exemplu, teniile pot infecta şi alte gazde, dar în afara celor specifice lor nu-şi mai pot completa ciclul de viaţă. Ele sunt eliminate de către gazda "adoptivă" a cărei rezistenţă ar fi controlată de gene dominante care, la speciile susceptibile la infecţii, ar fi recesive.

Este foarte greu de precizat în ce măsură controlul genetic interesează mecanismele nespecifice şi specifice de apărare. Astfel, recent, a fost lansată o ipoteză interesantă privind implicaţiile mecanismelor genetice în apărarea antiparazitară (fig. 202), care se bazează pe observaţii asupra modului de comportare a unor tulpini de şoareci la infectarea experimentală cu unii paraziţi.

Şoarecii pot fi infectaţi cu nematode, cum ar fi viermii din speciile *Trichinella spiralis* şi *Nematospiroides dubius*, a căror formă adultă colonizează intestinul subţire. În mod normal, pe suprafaţa celulelor antigen prezentatoare (APC) de şoarece sunt exprimate moleculele din clasa a II-a a complexului major de histocompatibilitate (MHC), a căror sinteză este controlată de către genele subregiunilor I-A şi I-E ale MHC. Cu alte cuvinte, celulele APC sunt $I\text{-}A^+$ şi $I\text{-}E^+$. Animalele aparţinând haplotipurilor s, b, q, f sunt $I\text{-}A^+$ şi $I\text{-}E^-$, produsele genelor I-E nefiind exprimate pe membrană.

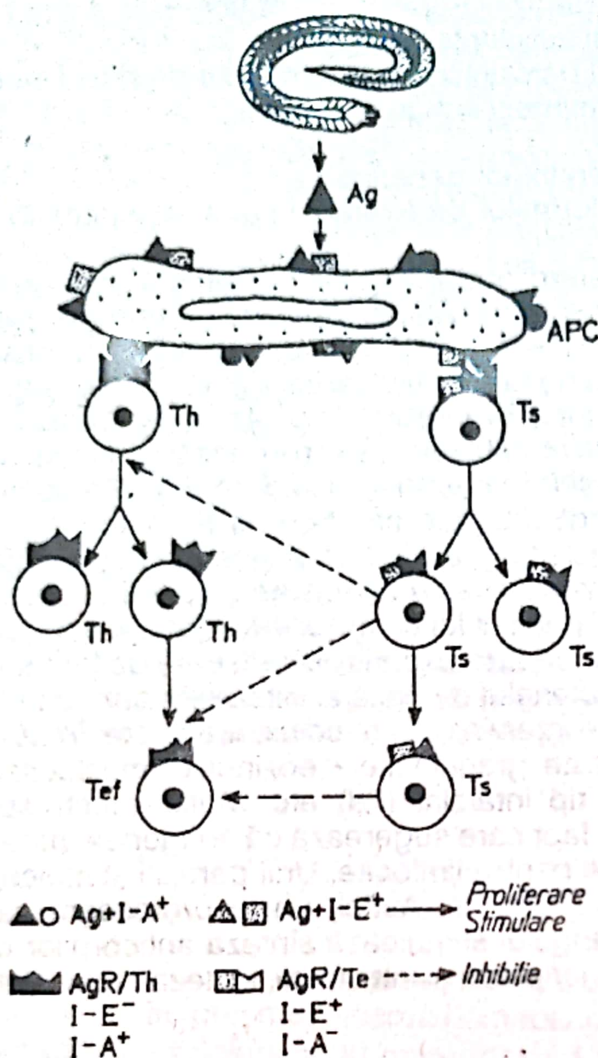



Fig.202. Controlul genetic în apărarea antiparazitară.

Antigenele parazitare (Ag) sunt exprimate pe membrana celulelor prezentatoare de antigen (APC) în asociere cu moleculele MHC de clasa II (I-A sau I-E la șoarece). Animalele, la care pe membrana celulelor APC sunt exprimate predominant moleculele I-A, vor reacționa față de antigenele parazitare, deoarece în această situație sunt stimulate limfocitele Th, la care receptorul pentru antigen este asociat cu I-A-. La animalele la care sunt exprimate predominant moleculele I-E, va fi stimulată proliferarea limfocitelor Ts, care vor supresa atât proliferarea Th cât și cooperarea acestora cu T efectoare (Tef). La adăpostul acestei supresii este favorizată multiplicarea paraziților (după D.L.Wassom și col.).

Experimental s-a constatat că șoarecii care exprimă mai multe molecule I-E sunt mai susceptibili la infecțiile cu acești paraziți în comparație cu cei I-A$^{+}$ – I-E$^{-}$ deci cu haplotipurile s, b, q și f, deoarece antigenele prezentate de către APC limfocitelor *T* în asociere cu moleculele I-E nu numai că nu stimulează proliferarea, dar chiar inhibă semnalele transmise pe I-A. Probabil că asemenea determinisme genetice sunt prezente la diverse niveluri ale mijloacelor de apărare. Ca și în infecțiile virale sau microbiene, un rol important revine barierelor tisulare, mișcărilor peristaltice ale intestinului, secrețiilor diverse, *p*H-ului etc. De asemenea, funcțiile fagocitare ale macrofagelor, granulocitelor, activitatea citotoxică a celulelor *NK,* intervenția factorilor solubili din ser de genul complementului etc. reprezintă tot atâtea mijloace de apărare nespecifică antiparazitară.

### Mijloace imunospecifice de apărare antiparazitară

În principal nu se deosebesc de cele care intervin în apărarea antivirală sau bacteriană, cu excepția faptului că, pe lângă mijloacele mediate umoral sau celular cunoscute, o contribuție majoră au unele clase de imunoglobuline, cum ar fi IgE, și unii efectori celulari de genul eozinofilelor, mastocitelor, bazofilelor etc.

*a. Efectori ai imunității mediate umoral.* În diferite infecții parazitare se înregistrează o sinteză activă de anticorpi cu specificitate față de diverși determinanți antigenici ai parazitului infectant. Aceștia au o mare importanță în infecțiile

parazitare cu localizare extracelulară, în prevenirea reinvaziei, atunci când paraziţii se află în afara celulei, dar îşi pierd posibilitatea de intervenţie atunci când aceştia pătrund în celulă fără exprimarea la suprafaţa ei de determinanţi antigenici sau fără alterarea membranei celulare. Anticorpii pot acţiona împreună cu sistemul complement direct asupra paraziţilor, provocând alterări ireversibile la nivelul acestora, pot bloca ataşarea lor la celulele sau ţesuturile pe care le infectează cu predilecţie, pot activa funcţiile fagocitare, ale macrofagelor sau neutrofilelor, intervin în uciderea paraziţilor prin mecanisme anticorp-dependente, mediate celular, efectuate de către celulele *K*, monocite etc. Diferitele tipuri de celule efectoare, în asociaţie cu diferite clase de imunoglobuline, acţionează selectiv faţă de paraziţi. Astfel, eozinofilele sunt celule care ucid eficace larvele de *Trichinella spiralis*, macrofagele distrug filariile etc. Sinteza activă de IgE în infecţiile cu unele nematode contribuie la activarea şi sensibilizarea mastocitelor şi bazofilelor care, la rândul lor, eliberează amine vasoactive capabile să provoace perturbări atât parazitului cât şi locului de cantonare a acestuia, făcând imposibilă prezenţa în continuare a agentului infectant.

Dar, antigenele parazitare pot acţiona şi ca activatori policlonali, activând nespecific proliferarea celulelor B şi sinteza imunoglobulinelor fără specificitate de anticorpi. Aşa s-ar explica hipergammaglobulinemia nespecifică, frecvent întâlnită în infecţiile cu localizare extracelulară sau intracelulară.

Prezenţa anticorpilor circulanţi cu specificitate faţă de paraziţi poate fi pusă în evidenţă prin reacţii de aglutinare, precipitare, de liză a paraziţilor sau celulelor parazitate, prin imunofluorescenţă indirectă, reacţii de fixare a complementului, de imobilizare a paraziţilor, de neutralizare, opsonizare etc.

Totuşi, anticorpii au un rol minor în apărarea antiparazitară. De exemplu, la păsări, s-a demonstrat existenţa de anticorpi faţă de coccidii, cum ar fi *Eimeria maxima, E. acervulina, E. tenella* etc., capabili să ofere un oarecare grad de protecţie a animalelor expuse la infecţii orale. La nivelul bilei şi serozităţilor intestinale a fost pusă în evidenţă existenţa de anticorpi din clasa IgA cu rol protector. Cu toate acestea, atât prin transfer pasiv de anticorpi cât şi prin bursectomii, s-a demonstrat că, deşi anticorpii au o oarecare contribuţie la protejarea animalelor faţă de coccidii, totuşi, această protecţie este de mică importanţă, rolul major revenind mijloacelor de apărare mediate celular şi în special limfocitelor *T* citotoxice.

*b. Efectori ai imunităţii mediate celular*. Şoarecii normali infectaţi cu *Trypanosoma cruzi* fac o boală uşoară care se vindecă în câteva zile (14 - 20 zile) cu expulzarea totală a paraziţilor. În cazul celor timectomizaţi neonatal sau al celor cu atimii congenitale (şoareci *Nu/Nu*) infecţia cu acest parazit evoluează dramatic, cu sfârşit letal. Aceste date dovedesc rolul major care revine limfocitelor *T* în protecţia faţă de aceşti paraziţi.

Dar cazul citat mai sus nu este singular. În infecţiile cu *Theileria parvum* care parazitează limfocitele bovinelor, are loc o distrugere "autoimună" a celulelor parazitare efectuată de către limfocitele *Tc*, distrugere care reprezintă modalitatea cea mai importantă de apărare imună a organismului faţă de acest parazit. Limfocitele *T* h (*CD4*$^+$) sunt foarte importante pentru eliminarea paraziţilor *in vivo*, în special a celor cu localizare la nivel eritrocitar. În funcţie de profilul citokinelor produse, limfocitele *T* aparţin, după cum se ştie, la două subgrupe funcţionale: *a)* $Th_1$ implicate în imunitatea mediată celular, sub controlul IFN$\gamma$, moleculele efectoare fiind TNF, $O_2^-$, oxidul nitric etc., şi *b)* $Th_2$ responsabile de imunitatea mediată umoral şi controlate de IL-4. În infecţiile parazitare aceste două căi imunologice acţionează adesea antagonist, o cale putând conferi rezistenţă

organismului faţă de paraziţi, iar alta, sensibilitate. În general, limfocitele $T$ h$_1$ sunt eficiente în cazul paraziţilor cu localizare în citoplasma macrofagelor, ca de pildă *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* etc.În aceste parazitoze, *T*h$_2$, respectiv IL-4, favorizează persistenţa parazitului dar conferă răspuns protector, prin reacţiile de tip inflamator pe care le provoacă în parazitoze cu localizare extracitoplasmatică de genul infecţiilor cu *Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygrus*, *Nippostrongylus Brasiliensis* etc.

Ciclosporina A, un represor al populaţiei celulare T şi un inhibitor al sintezei de IL-3 şi GM-CSF favorizează infecţia cu *Leishmania major* ca urmare a deprimării potenţialului imun de apărare. Existenţa unor funcţii normale ale macrofagelor şi limfocitelor *T* este absolut necesară, în special în fazele timpurii ale acestei infecţii, putând s-o blocheze foarte eficient. De asemenea, faptul că vaccinul anti-*Leishmania mexicana*, realizat prin purificarea glicoproteinei gp63 de pe suprafaţa promastigotelor, este protector datorită activării limfocitelor *T*, iar celulele devenite rezistente la infecţiile cu *Theileria parva* au bine exprimat pe membrana lor receptorul pentru IL-2 constituie dovezi categorice în favoarea rolului jucat de această clasă de limfocite în apărarea antiparazitară. În unele parazitoze, cum ar fi cele provocate de către oxiuri, trypanosome etc., limfocitele *T* eliberează limfokine care activează macrofagele, în sensul că acestea exprimă mai intens receptori pentru *Fc* sau pentru *C*3 prin intermediul cărora fagocitează şi reţin mai intens paraziţii. Totodată, ca urmare a acestei activări, eliberează cantităţi mari de radicali de oxigen de genul superoxid-anionului ($O_2^-$), oxigenului "unic" sau "singlet oxigen" ($^1O_2$), radicalului hidroxil ($OH^•$), peroxidului de hidrogen ($H_2O_2$) etc., prin intermediul cărora distrug paraziţii sau celulele infectate de către aceştia.

În cazul în care paraziţii nu mai pot fi eliminaţi, macrofagele şi limfocitele *T* eliberează factori fibrogenici locali, care stimulează formarea de granuloame cu încapsularea şi izolarea parazitului. Tot limfocitele *T* sunt responsabile de secreţia şi antrenarea eozinofilelor în infecţiile cu viermi intestinali. În acest scop, se eliberează un factor specific, promotor al stimulării eozinofilelor (ESP = Eosinophil Stimulated Promotor) care antrenează şi stimulează proliferarea acestor celule (fig. 203).

Eozinofilele acţionează pe două planuri distincte, şi anume: *a)* în asociaţie cu anticorpii, ca celule efectoare ale citotoxicităţii mediate celular anticorp-dependente (ADCC) şi *b)* prin eliberarea de enzime consecutiv degranulării lor, enzime care, împreună cu cele eliberate de către mastocite, vor controla permeabilitatea vaselor, provocând inflamaţii la locul de cantonare a parazitului şi, ca atare, condiţii de "disconfort" pentru acesta.

Macrofagele şi limfocitele *T* activate pot produce TNF$\alpha$, TNF$\beta$, IFN$\gamma$ etc. În malarie, unde agentul etiologic este *Plasmodium falciparum*, sunt paroxisme febrile şi uneori severe complicaţii cerebrale. Simptomatologia clinică în această boală se pare că este expresia stimulării de către produsele de origine parazitară, în timpul ruperii eritrocitului, a monocitelor şi limfocitelor *T*. Acestea vor elibera în cantităţi mari TNF şi IFN$\gamma$ care vor declanşa paroxisme febrile şi simptomatologia cerebrală. Deci, TNF, poate reproduce fidel simptomatologia malariei. Produsele de degradare a parazitului stimulează în mod diferit limfocitele T$\alpha\beta$ şi T$\gamma\delta$. Aceste două populaţii celulare, deşi se deosebesc între ele în ce priveşte restricţia MHC, se aseamănă prin efectul lor citotoxic şi capacitatea de a secreta IL-2, IFN$\gamma$, TNF$\alpha$ şi TNF$\beta$.

În afară de limfokinele care activează macrofagele, eozinofilele, mastocitele etc., limfocitele *T* eliberează şi factori nespecifici care acţionează asupra epiteliului intestinal, stimulând secreţia şi mişcările peristaltice, mişcări care vor contribui la eliminarea parazitului.

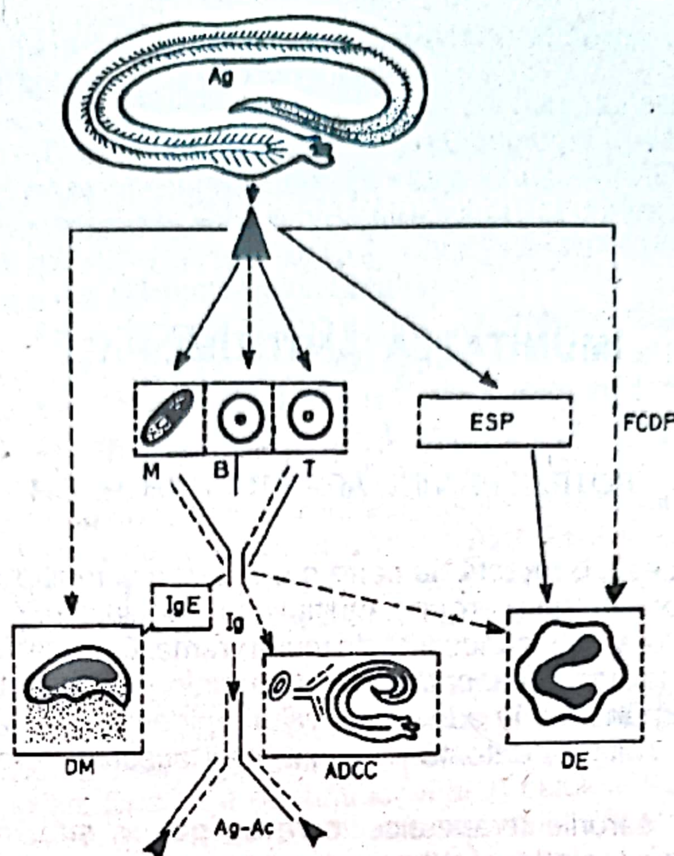



Fig.203. Diferitele modalităţi de reacţii imune antiparazitare.

Antigenele parazitare (Ag) stimulează macrofagele (M), limfocitele B (B) şi T (T). Limfocitele B stimulate sintetizează anticorpi (ig) care vor neutraliza paraziţii prin reacţii imune mediate celular (ADCC), prin fixarea antigenelor parazitare circulante (Ag-Ac), prin degranularea mastocitelor (DM) sau a eozinofilelor (DE). Aceste degranulări sunt realizate de anticorpi din clasa IgE. Totodată este stimulată sinteza de "factori promotori ai eozinofiliei" (ESP) şi de "factori chemotactici, derivaţi din paraziţi" (FCDP) care activează eozinofilele, atrăgându-le la locul de cantonare a paraziţilor (după I. Roitt şi col.).

Desigur, în infecţiile parazitare ca de altfel şi în agresiuni de alt gen, cum ar fi cele provocate de către virusuri şi bacterii, nu sunt implicate doar unul sau altul dintre mijloacele de apărare imună. De regulă, cooperează un mare număr de astfel de mijloace care pot sau nu pot duce la neutralizarea şi eliminarea agresorului.

În concluzie, se poate afirma că prezenţa paraziţilor antrenează un complex de mijloace nespecifice sau specifice de apărare, în cadrul cărora se instalează cooperări celulare şi sunt antrenate mecanisme de reglare a lor. Cele mai proeminente dintre acestea ar fi supresiile specifice, care inhibă activarea policlonală a limfocitelor şi proliferarea lor. Dar, în absenţa factorilor carenţiali sau a stresului provocat de către diferite cauze, această inhibiţie se reflectă şi asupra celulelor *T* supresoare, care nu vor mai prolifera şi nu vor mai fi active funcţional, ajungându-se la depresia întregului mecanism cu revenirea la normal a funcţiilor imune, exceptând pe cele care vizează specific parazitul infectant.

# IMUNITATEA ANTITUMORALĂ

## IPOTEZE PRIVIND APARIŢIA TUMORILOR

Boala canceroasă, generată de către modificarea şi multiplicarea anarhică a celulelor diferitelor ţesuturi şi organe, multiplicare asociată cu pierderea funcţiilor normale ale acestora, este cunoscută de multă vreme. Dar, atât timp cât omenirea a trăit sub ameninţarea permanentă a bolilor cu etiologie virală şi bacteriană, dintre care unele se răspândeau în adevărate "valuri epidemice" devastatoare, atenţia acordată bolilor maligne, datorită nedifuzibilităţii acestora, era situată pe plan secundar.

Vaccinurile şi serurile terapeutice, care au permis stăpânirea şi controlul eficient al bolilor contagioase şi chiar eradicarea unora dintre ele (variola), au creat condiţiile evaluării mai corecte a gravităţii tumorilor maligne, nu numai pentru individ dar şi pentru societate, ravagiile produse de cancer devenind evidente şi din ce în ce mai alarmante.

Cercetările fundamentale în domeniul imunologiei tumorale au început la sfârşitul secolului XIX şi continuă şi în prezent. Pentru a descifra şi a explica modul de apariţie a cancerului, au fost emise diferite ipoteze, ca de pildă ipoteza "embrionară", "iritativă", "virală" etc.

Prima susţinea că celula care este capabilă să se înmulţească activ şi anarhic provine dintr-o celulă tânără, nediferenţiată, care este de fapt o celulă embrionară cantonată în ţesuturile organismului unde a rămas încă din stadiul de dezvoltare embrionară a acestuia şi care, la un moment dat, începe să se multiplice devenind nocivă pentru organism. Într-adevăr, între celulele tinere ale embrionului şi cele cu caracter neoplazic apărute la adult există foarte multe asemănări: şi unele şi altele au un potenţial proliferativ mare, exprimă slab unele antigene, dar au alţi determinanţi antigenici comuni, cum ar fi antigenul carcinoembrionar (CEA) sau alfa-fetoproteina (AFP), care nu sunt exprimate deloc sau sunt exprimate foarte slab pe celulele normale.

Ipoteza iritativă susţine că iritarea permanentă a unui ţesut poate duce la malignizarea lui. Experimental s-a reuşit provocarea de cancere cutanate prin iritarea repetată a pielii cu gudroane. Cancerul buzelor şi cancerul bronho-pulmonar, atât de frecvent la fumători, susţine această ipoteză. Substanţele chimice cu efect carcinogen ar produce mutaţii şi deviaţii spre proliferare neoplazică. Dar, s-a constatat că potenţialul carcinogen al unor produse chimice variază condiţionat de specia sau tulpina de animale testată. Pe de altă parte, unele substanţe necarcinogene pot produce mutaţii, altele pot fi iritante puternice dar slab mutagene, iar altele sunt slab iritante dar puternic mutagene. Mai mult, unii constituenţi naturali ai organismului, ca de pildă hormonii steroizi, când depăşesc o anumită concentraţie, pot fi carcinogeni. De asemenea, tran-

splantarea experimentală a unor ţesuturi endocrine în splina animalelor poate duce la malignizarea lor.

Ipoteza virală este susţinută de către o serie de date consistente. Leucemia bovină, leucoza păsărilor sunt boli neoplazice cu etiologie virală certă. Este bine studiată carcinogeneza spontană dată de către virusul MAREK, un virus ADN herpetic, agent cauzal al unei neurolimfomatoze a puilor cunoscută sub denumirea de "boala lui Marek". Leucemia felinelor generată de un oncornavirus provoacă o boală similară leucemiei limfoblastice umane.

La om, singurul virus cunoscut până în prezent, care ar putea fi incriminat ca agent etiologic al unei boli neoplazice este virusul EPSTEIN-BARR (EBV) responsabil de limfomul Burkitt frecvent în Africa, de carcinomul nasofaringian, de limfomul imunoblastic consecutiv transplantului renal şi, bineînţeles, de mononucleoza infecţioasă virală. În aceste boli, genomul EBV este prezent în materialul nuclear al celulelor maligne, iar în serul pacienţilor există o cantitate apreciabilă de anticorpi anti-EBV. Aceste date au sugerat rolul EBV în etiologia tumorilor maligne limfoide: el ar stimula răspunsul imun şi proliferarea celulelor limfoide, dar diferenţierea neoplazică ulterioară a acestora ar fi indusă de către alţi factori şi nu de către el.

Şi virusul hepatitei epidemice B (HBs) a fost incriminat ca agent responsabil de generarea carcinomului hepatic, în celulele care înconjoară procesul neoplazic propriu-zis găsindu-se inserat genomul viral, care însă nu este inserat în celulele tumorale propriu-zise. Existenţa genomului viral în celulele eukariote, prezenţa virionilor sau a anticorpilor antivirus sugerează implicaţia virală în unele boli tumorale, dar semnificaţia acestei implicaţii este încă puţin cunoscută. Nu se ştie dacă nu cumva prezenţa virusului nu este efectul unor modificări produse la nivelul celulei de către alţi factori, încă necunoscuţi, care au favorizat penetrarea virală şi proliferarea neoplazică, în acest proces virusul fiind un simplu "musafir inocent". Poate aşa s-ar explica de ce cercetările numeroase şi aprofundate, care încearcă să stabilească etiologia virală a diferitelor tipuri de tumori la om, au dat până în prezent rezultate negative.

Aşadar, nici una dintre ipotezele amintite nu este universal valabilă, din care cauză, recent, se acordă o mare atenţie unor posibile relaţii care ar exista între unele gene "oncogene" şi procesul tumoral. Cercetările fundamentale privitoare la baza moleculară a oncogenezei au semnalat existenţa unor gene, denumite "oncogene", capabile să provoace *in vitro* transformarea neoplazică a celulelor normale. Aceste oncogene se găsesc în genomul retrovirusurilor şi ar fi responsabile de transformarea neoplazică a celulelor eukariote ca rezultat al infectării acestora cu virusurile oncogene. Dar, s-a constatat că şi celulele animale normale conţin secvenţe de gene omoloage oncogenelor, numite "proto-oncogene". Proto-oncogenele nu provoacă transformări neoplazice, ele codificând pentru diferite proteine implicate în reglarea multiplicării normale a celulelor, ca de pildă unii factori de creştere, receptori de membrană pentru astfel de factori, proteine care transduc semnalele exogene către nucleu, proteine care reglează transcrierea acestor semnale la nivelul nucleului etc. Funcţia de control al proto-oncogenelor şi produselor lor poate fi însă alterată prin mutaţii, translocări, rearanjări genice defectuoase etc., toate acestea ducând la pierderea funcţiilor normale ale celulei. Deci, proto-oncogenele nu sunt gene "nocive", ele având funcţii normale de codificare a unor molecule implicate în procesele fundamentale ale vieţii celulei şi care în esenţă sunt creşterea, proliferarea şi diferenţierea ei.

Proto-oncogenele celulelor eukariote au fost încadrate în două grupe distincte:

a. Proto-oncogene provenite din oncogenele retrovirusurilor ca urmare a inserării lor în genomul celulelor infectate. Este cazul *ab1*, *erbB*, *fos*, *jun*, *myc*, *myb*, *Ha-ras*, *sis*, *src* etc.

*b.* Proto-oncogene care nu au corespondent retroviral, cum ar fi *bc1, bcr, met, int1, N-myc, N-ras* etc. Aceste două grupe de gene codifică pentru sinteza unor proteine cu activitate kinazică, capabile de fosforilarea altor proteine (*erbB, src, c-kit, raf* etc.), pentru unele proteine cu funcţii la nivelul nucleului (*fos, myc, jun, myb* etc.) sau pentru proteine care participă probabil la transmiterea de semnale extracelulare cum ar fi p21 codificată de protooncogenele *ras* (tabelul 110).

*Tabelul 110*

**Diferite clase de proteine codificate de proto-oncogene. Localizare şi funcţii (după D. Morello şi Ch. Babinet)**

| Activitate | Proto-oncogena | Omolog cu | Dimensiuni | Localizare | Funcţie |
|---|---|---|---|---|---|
| Tirozin-kinazică | c-erbB | Receptorul pentru EGF | 170 K | Pe membrana plasmatică a multor celule | Leagă EGF |
| | c-fms | Receptor pentru CSF-1 | 140 K | Pe membrana macrofagelor şi celulelor extraembrionare | Leagă CSF-1 |
| GTP-ază | c-ki-ras 2<br>c-Ha-ras-1<br>N-ras | – | 21 K | La numeroase celule, pe latura citoplasmatică a membranei | Leagă GTP-aza la GTP şi GDP |
| Proteine nucleare | c-fos | – | 55 K | Puternic exprimate în nucleul celulelor hematopoietice, macrofagelor etc. | Leagă indirect ADN |
| | c-jun | AP-1 | 62 - 64 K | • | • |
| | c-myc<br>N-myc<br>L-myc | – | 62 - 64 K | • | • |
| Diversă | c-erb-A | Receptorii pentru hormonii tiroidieni | ? | Citoplasmică şi nucleară | Leagă tiroxina |
| | c-sis | Lanţul $\beta$ al PDGF | ? | Proteină secretată | Leagă receptorul la PDGF |

CSF= factorul de stimulare a coloniilor; EGF= factorul de creştere a epidermului; GTP, GDP= guaniđin tri- şi difosfat; PDGF= factorul de creştere derivat din trombocite.

În anul 1983 s-a demonstrat pentru prima dată că o genă oncogenă poate codifica pentru sinteza unor molecule implicate în controlul creşterii celulei. Este cazul oncogenului *V-sis* al virusului sarcomatos al maimuţelor (SSV), care poate

produce cancerul la aceste animale şi care codifică o proteină omoloagă structural şi funcţional cu produsul proto-oncogenei *c-sis*, produs care nu este altceva decât lanţul $\beta$ al factorului de creştere derivat din trombocite (PDGF).

*In vivo,* SSV transformă neoplazic celulele care au receptori pentru PDGF, inducând un semnal permanent de stimulare a creşterii.

Oncogenele pot codifica pentru receptorii factorilor de creştere, primul studiat din acest punct de vedere fiind oncogenul *V-erbB* al virusului eritroblastozei aviare. Acest retrovirus are gena *V-erbB* care transformă selectiv celulele liniei eritroide provocând creşterea necontrolată a eritroblaştilor. Aceştia pot deveni eritrocite mature şi în absenţa eritropoietinei, deoarece proteina $GP74^{N\text{-}erbB}$, un produs al oncogenei *V-erbB*, este o formă modificată a receptorului pentru EGF şi are activitate tirozin-kinazică putându-se autofosforila. Şi alte gene implicate în procesele de transformare tumorală s-au dovedit a codifica pentru proteinele transmembranare, bogate în cisteină şi cu activitate tirozinkinazică, capabile potenţial de fixarea unor factori de creştere. Ele pot participa la procesele normale de dezvoltare celulară datorită implicaţiilor lor în procesele de proliferare şi diferenţiere ale acesteia.

Dar, dacă funcţia unor oncogene este bine cunoscută, activitatea şi rolul lor biologic mai necesită elucidări. O genă, care codifică pentru un factor de creştere, pentru unii receptori ai unor factori de creştere, sau pentru unele proteine implicate în mecanismele de reglare a transmiterii la nivel citoplasmatic sau al transcrierii la nivel nuclear a mesajelor, poate suferi modificări şi influenţe care să-i devieze funcţiile. La baza acestor devieri ar sta unele intervenţii virale, retrovirusurile oncogene înglobând în genomul celulelor eukariote infectate, material genetic oncogen care va conferi celulei gazdă o capacitate de proliferare anormală.

Din păcate, cu toate eforturile depuse, conceptul influenţei genetice în declanşarea bolii neoplazice este departe de a elucida multe aspecte teoretice. Celula transformată de către oncogene este o realitate, sau oncogenele sunt mai bine exprimate în celule transformate din alte cauze? Celula transformată neoplazic îşi modifică antigenicitatea? Apar antigene specifice tumorii? Pot fi recunoscute aceste antigene de către sistemul imun al gazdei? Tumora este cauza sau efectul unor disfuncţii ale sistemului imun?

## ANTIGENE TUMORALE

Existenţa unor relaţii între dezvoltarea tumorii maligne şi potenţialul de apărare al organismului a fost intuită încă din secolul XVIII, dar abia în secolul nostru a putut fi pusă în evidenţă existenţa unor reacţii imune antitumorale prin folosirea în acest scop a unor tumori induse experimental şi a liniilor singenice şi transgenice de animale de laborator. A fost chiar imaginată o posibilitate de manipulare a răspunsului imun în combaterea tumorilor prin folosirea unor "gloanţe magice" formate din anticorpi care să poarte diferiţi agenţi toxici pentru celule şi care ar fi capabili să distrugă selectiv tumora fără a leza ţesuturile normale.

Unul dintre primele argumente în favoarea existenţei unui răspuns imun antitumoral a fost dat de cercetarea histologică a tumorilor. Tumorile solide sunt mai mult sau mai puţin infiltrate cu celule fagocitare şi cu limfocite, infiltraţie care, în multe cazuri, ca de pildă în cancerul de sân, în carcinoamele medulare etc., este un indicator de prognoză pozitivă. Această infiltrare denotă că ţesutul tumoral este recunoscut ca non-propriu şi atacat de către celulele efectoare ale sistemului

imun. Într-adevăr, tumorile induse experimental la animalele de laborator sunt foarte imunogene, fiind rejectate chiar şi atunci când sunt transplantate la animale singene. Limfocitele *T* ale animalelor care au rejectat tumora asigură protecţie antitumorală specifică gazdelor în care au fost transferate, fapt care constituie o dovadă certă a intervenţiei mecanismelor imune de apărare, în care nu anticorpii ci limfocitele *T* au un rol protector major. Dar, spre deosebire de tumorile induse experimental cu ajutorul unor substanţe mutagene, cele apărute spontan nu se dovedesc a fi tot atât de imunogene, neînregistrându-se represia lor spontană sau imunizarea specifică, deşi tumora are un număr mare de epitopi. De exemplu, animalele imunizate cu tumori apărute spontan, a căror multiplicare a fost blocată prin iradiere cu raze X sau tratate cu mytomicină, nu au fost protejate atunci când au primit un nou inocul cu celule neiradiate X, dezvoltând tumori cu aceeaşi virulenţă ca şi martorii neimunizaţi.

La om, neoplasmele apar spontan şi, ca şi în cazul tumorilor spontane ale animalelor, nu regresează, iar imunizarea pacientului cu propria tumoră inactivată este practic imposibilă. Cu toate acestea, sunt cazuri în care îndepărtarea tumorii, fără a avea pretenţii că s-a realizat eliminarea totală a ei, duce la vindecare. În mod cert, după extirparea chirurgicală, au mai rămas celule tumorale care ar fi putut regenera tumora primară sau genera metastaze, dar aşa ceva nu se mai observă chiar după decenii de la operaţie, pacientul vindecându-se.

*S-a pus şi se mai pune încă problema existenţei unor antigene specifice tumorii.* S-a susţinut că transformarea malignă poate fi asociată unor modificări fenotipice caracterizate printre altele de pierderea unor antigene proprii celulei normale şi câştigarea altora, specifice celulei transformate malign. Aceste neoantigene nu ar fi detectabile la nivelul ţesuturilor normale, fiind recunoscute ca aloantigene şi neutralizate rapid de către sistemul imun al gazdei. Alte afirmaţii pledează pentru lipsa totală de antigene particulare pe suprafaţa tumorii, sprijinindu-şi afirmaţiile pe lipsa de rejecţie a tumorilor spontane şi pe acceptarea unor celule tumorale transplantate experimental de către toate animalele aparţinând unei specii, indiferent de caracterul lor genetic, cum este cazul tumorilor Ehrlich şi Krebs, tumori care sunt acceptate de şoarecii cu cele mai diverse haplotipuri.

Un concept intermediar celor două extreme susţine că antigenele tumorale sunt slab exprimate, sunt foarte eterogene, modulează rapid, din care cauză recunoaşterea şi eliminarea lor este dificilă. Este adevărat că o tumoră este extrem de eterogenă atât din punct de vedere al antigenicităţii sale, cât şi din punct de vedere al potenţialului de creştere sau de metastazare, fiind alcătuită din diferite clone de celule, derivate din mutanta iniţială, şi care sunt expresia labilităţii genetice a acesteia.

Conform conceptului actual, antigenele tumorale ar putea fi încadrate în patru categorii diferite:

*a.* Antigene specifice unui anumit tip de tumoră, care nu sunt prezente pe suprafaţa celulelor normale sau pe alte celule tumorale (TSTA = antigene de transplantare specifice tumorii sau "tumor specific transplantation antigens"). Ar fi cazul unor produse ale unor oncogene activate prin mutaţii ($p21^{ras}$, p 210 ) a carcinoamelor cervicale asociate cu virusul papilomatozei umane etc.

*b.* Antigene specifice unei anumite tumori care însă se găsesc slab exprimate şi pe unele celule normale (TSA = antigene specific tumorale sau "tumor specific antigens"). Este cazul antigenului TLA de la şoarece, prezent atât pe limfocitele *T* normale cât şi pe cele leucemice.

*c.* Antigene cu specificitate largă, prezente pe diferite tipuri de tumori (TATA = antigene tumorale asociate antigenelor de transplantare sau "tumor associated transplantation antigens").

*d.* Antigene "oncofetale" care în mod normal sunt exprimate pe ţesuturile embrionare, dintre care cele mai bine cunoscute sunt alfa-fetoproteina (AFP) prezentă în unele stadii fiziologice de dezvoltare a organismului şi în special în stadiul embrionar, în unele lichide fiziologice cum ar fi lichidul amniotic precum şi în diferite stări patologice (hepatomul malign, teratocarcinoame, degenerescenţe hepatice etc.). Tot în această grupă poate fi încadrat antigenul carcinoembrionar (CEA), o glicoproteină eterogenă prezentă la nivelul colonului fetal, iar la adult în caz de carcinom al colonului.

La om, evidenţierea antigenelor specific tumorale este mai dificilă, deoarece nu pot fi puse în evidenţă prin aplicarea unor metode experimentale cum ar fi transplantările practicate experimental. Nu a fost posibilă nici decelarea unor reacţii *in vitro* din partea celulelor bolnavului cultivate în prezenţa antigenelor tumorii proprii şi nici reacţii alogene între limfocitele unui subiect sănătos cultivate în prezenţa unor celule tumorale provenite de la un alt pacient, din cauza antigenelor HLA diferite ale celor doi donatori. Totuşi, într-un studiu efectuat pe 12 000 pacienţi cu cancer, au fost identificate complexe imune circulante, nişte agregate formate din anticorpi şi probabil din antigenele tumorale solubile, complexe care la pacienţii aflaţi într-un stadiu avansat de boală se găseau în concentraţie mare, iar la cei cu remisiune, practic dispăreau pentru ca să reapară o dată cu refacerea tumorii. Deşi natura acestor complexe antigen-anticorp este încă puţin cunoscută, totuşi aceste date sugerează existenţa unor antigene tumorale capabile să inducă sinteza unor anticorpi şi să reacţioneze specific cu aceştia. De altfel, recent, au putut fi puse în evidenţă antigene tumorale proprii unor tumori umane cum ar fi melanomul, cancerele intestinale, leucemiile.

Antigenele TSTA nu stimulează sinteza anticorpilor ci proliferarea clonală a limfocitelor *T* citotoxice, aşa că încercarea de evidenţiere a lor prin mijloace serologice poate da rezultate fals negative. De altfel, nu este obligatoriu ca antigenele tumorale să fie exprimate numai pe suprafaţa membranei plasmatice a celulei, ele putând fi localizate şi la alte nivele.

De exemplu, recent s-a constatat că celulele tumorale de şoarece pot genera *in vitro* variante foarte imunogene care însă nu pot prolifera neoplazic şi care sunt rejectate de şoarecii singenici. Aceste variante, denumite $tum^-$ ("tumor negative") derivate din celule originale care pot forma tumori ($tum^+$), exprimă antigene noi de transplantare, care lipsesc la celulele originale. Ca şi antigenele TSTA, antigenele $tum^-$ prezintă o mare variabilitate, stimulează proliferarea clonală a limfocitelor *Tc* dar nu şi sinteza de anticorpi, neputând fi izolate prin imunoprecipitare. S-a reuşit identificarea a trei gene care codifică pentru trei antigene $tum^-$, constatându-se că structura lor este total diferită de cea a genelor care codifică pentru imunoglobuline sau pentru moleculele complexului major de histocompatibilitate. De asemenea, organizarea lor diferă de cea a altor gene cunoscute până în prezent, diferind între ele prin mutaţii punctiforme existente la nivelul unui singur exon, care generează modificarea poziţională a unui singur aminoacid în lanţul polipeptidic a cărei sinteză este controlată de către gena respectivă. Aceste mutaţii ar fi responsabile de exprimarea şi diversitatea antigenelor $tum^-$.

S-a constatat că două gene $tum^-$ codifică pentru proteine lipsite de extremitatea $NH_2$ terminală tipică. Se pare deci că mutaţiile în genomul celulelor eukariote pot genera formarea unor peptide antigenice care nu stimulează sinteza de anticorpi, dar care pot fi recunoscute de către limfocitele *T*.

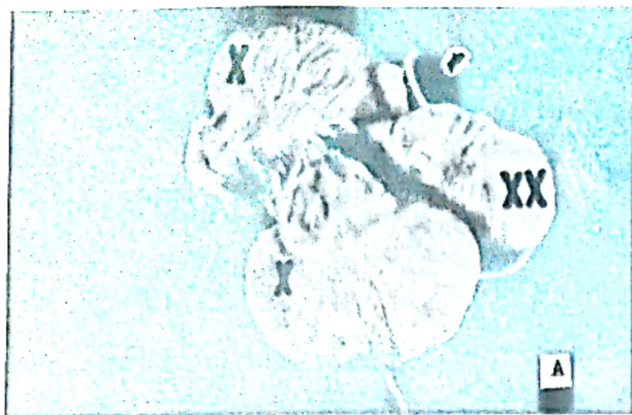



Fig. 204 A. Şoareci cu tumora ascitogenă Ehrlich (x) şi şoareci normali (xx).

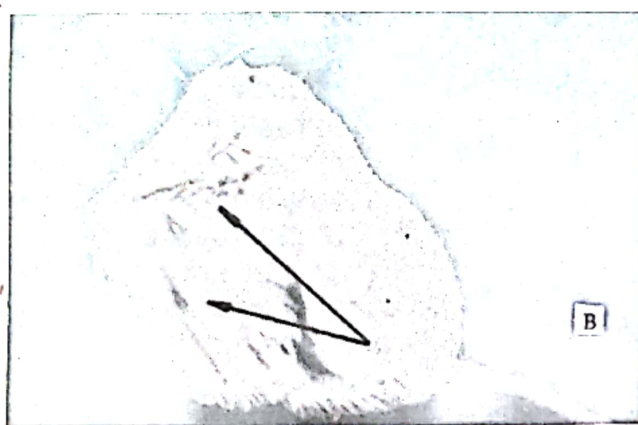



Fig. 204 B. Şoareci inoculaţi s.c. cu $1 \cdot 10^6$ celule Ehrlich dezvoltă o tumoră solidă (săgeţile).

Dar, şi în cazul tumorilor considerate "universale" pentru că ar fi lipsite de determinanţi antigenici, problema este discutabilă. După cum menţionam anterior, tumora ascitogenă Ehrlich este considerată universală deoarece nu este rejectată dacă este inoculată intraperitoneal la şoarece, unde formează o ascită în cavitatea abdominală urmată de moartea animalului (fig. 204). Indiferent de tulpina de şoareci, inoculul intraperitoneal al unui număr mic de celule Ehrlich este letal, după 10 - 14 zile, în lichidul de ascită găsindu-se un număr foarte mare de celule tumorale. Lipsa aparentă a oricăror reacţii de apărare din partea gazdei a fost explicată ca fiind consecinţa unei lipse a stimulilor antigenici generaţi de către această tumoră. Totuşi, încă de prin anii 60 s-a semnalat faptul că eliminarea ascitei poate duce la vindecarea animalului. Mai mult, acesta devine imun, nemaidezvoltând tumora ascitogenă după o nouă inoculare de celule. Dacă însă celulele tumorale sunt inoculate pe cale subcutanată, la locul de inoculare se dezvoltă o formaţie solidă, neletală, care este rejectată.

Într-o serie de experimente noi am încercat să verificăm dacă într-adevăr tumora ascitogenă Ehrlich este lipsită de imunogenitate. În acest scop şoarecii au fost inoculaţi pe cale subcutanată cu $1 \cdot 10^6$ celule tumorale suspensionate în 0,5 ml de mediu de cultură $IC_{65}$. Cei care au rejectat tumora solidă formată după acest inocul au primit intraperitoneal acelaşi număr de celule. Animalele astfel tratate nu au mai dezvoltat ascita, inoculul subcutanat dovedindu-se a fi imunizant. De aici concluzia că şi tumora ascitogenă Ehrlich posedă determinanţi antigenici, fiind deci imunogenă.

Dar, rezultatele obţinute au generat unele întrebări: *a)* există un singur determinant sau mai mulţi determinanţi antigenici?; *b)* aceştia sunt exprimaţi numai la suprafaţa membranei plasmatice sau şi în straturile mai profunde ale ei?; *c)* de ce aceeaşi tumoră este letală şi neimunogenă atunci când este inoculată intraperitoneal şi este neletală dar imunogenă atunci când este inoculată subcutanat?

Tratând menajant celulele Ehrlich cu pronază (50 $\mu$g pronază pentru $1 \cdot 10^6$ celule), o enzimă care desface legăturile dintre aminoacizii lanţului polipeptidic până la nivelul inserţiilor hidraţilor de carbon, am constatat că animalele imunizate prin inocul subcutanat cu celule netratate enzimatic nu dezvoltă ascita dacă primesc intraperitoneal celule normale sau celule tratate cu pronază. Dacă, însă,

stimulul antigenic subcutanat se face cu celule tratate enzimatic, atunci protecţia se realizează numai în cazul inoculului intraperitoneal cu astfel de celule, dar nu şi cu cele normale, netratate cu pronază. De aici concluzia că tumora ascitogenă Ehrlich are determinanţi antigenici proprii, aceştia au cel puţin două specificităţi diferite, iar aceste specificităţi se găsesc la diferite nivele ale membranei plasmatice.

Inexistenţa unor reacţii imune din partea gazdei şi letalitatea provocată de tumoră atunci când este inoculată intraperitoneal ar fi consecinţa sintezei şi secreţiei, de către ea, a unor produse care iniţial îi "maschează" determinanţii antigenici şi care sunt puternic inhibitori ai funcţiilor imune mediate celular. Pentru a permite mijloacelor imune de apărare a gazdei recunoaşterea şi eliminarea ei, este necesară realizarea unui contact rapid între aceasta şi celulele sistemului imun, situaţie realizabilă pe cale subcutanată, dar nu şi intraperitoneală, unde celula Ehrlich poate să elibereze unii factori care o "camuflează" şi care supresează funcţiile imune ale gazdei. Ipoteza, poate simplistă, a putut fi parţial confirmată experimental: inocularea subcutanată a celulelor tumorale suspensionate în lichid de ascită facilitează dezvoltarea tumorii solide care, deşi poate ajunge la dimensiuni uriaşe, nu imunizează animalul.

Cele expuse mai sus ilustrează gradul de incertitudine şi confuzie care există în prezent în problema antigenicităţii tumorii. Se pare că ţesutul neoplazic ar avea determinanţi antigenici proprii, dar exprimarea acestora şi mai ales recunoaşterea lor de către efectorii sistemului imun al gazdei sunt condiţionate de către o serie de factori încă necunoscuţi. În mod cert, în momentul de faţă nu se cunosc încă multe elemente care intervin în relaţia gazdă-tumoră şi poate chiar modul nostru de gândire este încă prea "tradiţional", fapt care ne face să abordăm această problemă complexă într-o manieră "clasică", valabilă pentru relaţiile organism-alogrefă de ţesut normal, dar poate nu şi pentru alt tip de agresiune. Poate că proliferarea neoplazică este un proces biologic apropiat de cele normale, dar care are unele particularităţi pe care încă nu le înţelegem şi, ca atare, nu le putem influenţa şi stăpâni.

## MECANISME ŞI MIJLOACE DE APĂRARE ANTITUMORALĂ

A fost semnalată existenţa mai multor mijloace de care dispune organismul pentru neutralizarea oncogenezei şi prevenirea ei. Dintre acestea, ar fi limfocitele *T* citotoxice (*T* c), macrofagele cu funcţii citotoxice specifice şi nespecifice, celulele *NK*, diferite tipuri de celule efectoare ale citotoxicităţii mediate celular anticorp-dependente (ADCC), anticorpii, unele limfokine etc.

Existenţa limfocitelor *Tc* cu funcţii antitumorale a fost dovedită în sarcomul MOLONEY şi în limfomul BURKITT, ambele induse probabil viral. Sarcomul MOLONEY este foarte imunogen şi poate regresa spontan, înainte de începutul regresiei şi în timpul ei, tumora fiind infiltrată cu limfocite *Tc* care se dovedesc citotoxic specifice *in vitro* şi care dezvoltă răspuns imun secundar atunci când animalul care a rejectat sarcomul este reinoculat cu el. În cca. 38% dintre tumorile spontane la om, s-a constatat infiltraţia lor cu limfocite, dintre care 18-87% aparţineau populaţiei de celule *T* şi numai 1% populaţiei *B*. Din totalul celulelor *T* doar 26% s-au dovedit a fi citotoxice *in vitro* faţă de tumora autologă şi numai la un raport mare (50:1) de celule efectoare *T* /celule ţintă tumorale. Aceste date sugerează că numai o proporţie mică de limfocite *T* din populaţie care infiltrează

tumora sunt celule cu funcţie citotoxică specifică. De aici şi speculaţia că limfocitele *Tc* ar fi eficiente în regresia tumorilor induse viral, care sunt puternic imunogene, dar ar juca un rol modest în cele apărute spontan, care sunt slab imunogene şi care sunt atacate în special de macrofage, celulele *NK* şi poate şi de alte celule, ca de pildă cele cu funcţii efectoare ADCC.

Şi în sângele periferic al pacienţilor au fost găsite limfocite *T* cu funcţie citotoxică faţă de tumora autologă. Pentru analiza sistematică a lor, au fost necesare izolarea clonelor citotoxice şi multiplicarea lor *in vitro*. Această metodă a permis identificarea unor clone de celule *T* reactive faţă de unele tumori, ca de exemplu faţă de melanomul uman, unde s-au găsit patru clone de celule specializate în recunoaşterea a cel puţin patru antigene diferite. Multiplicarea lor *in vitro*, în special a celor care infiltrează tumora, în prezenţa de IL-2 şi apoi reinocularea lui au avut efect benefic la 25 - 40% dintre pacienţii care au beneficiat de un astfel de tratament.

Investigaţiile privind relaţia limfocit *T*-tumoră se adresează aproape în exclusivitate celulelor *Tc*, încercându-se evaluarea lor funcţională. Dar nu este exclus ca şi alte subpopulaţii de limfocite *T*, care nu au funcţii citotoxice, să deţină unele atribute funcţionale în apărarea antitumorală. Ele ar putea participa indirect la liza celulei tumorale prin eliberarea de limfokine, având astfel un rol reglator asupra altor efectori ai imunităţii.

Datele obţinute până în prezent demonstrează că un răspuns imun antitumoral eficient necesită următoarele condiţii: *a)* prezenţa determinanţilor antigenici la nivelul celulelor neoplazice; *b)* exprimarea acestora pe suprafaţa celulei; *c)* legarea lor la moleculele MHC; *d)* limfocitele efectoare să poată avea acces la celula tumorală; *e)* antigenele exprimate să stimuleze atât limfocitele *Tc* cât şi pe cele *Th*.

Bineînţeles că, pentru declanşarea răspunsului imun în cazul în care condiţiile menţionate sunt asigurate, este necesară realizarea unui contact intim între celulele efectoare şi celula tumorală.

Aderarea între aceste celule este activ reglată de către o serie de evenimente chimice care au loc în cursul activării celulare şi în care, în afară de integrine şi selectine, sunt antrenate şi moleculele accesorii ale limfocitelor *T*, *CD*4 şi *CD*8, cu dublu rol funcţional: de aderare propriu-zisă şi de asociere intimă cu complexul receptorului pentru antingen şi tirozinkinaza $p56^{lck}$ de pe *T*. Nu este exclus ca unii factori produşi de către celula tumorală să blocheze aderarea celulelor efectoare, anulând efectul stimulant al antigenelor ei.

În afară de limfocitul *T*, considerat a fi efectorul esenţial al răspunsului imun antitumoral, multe funcţii de apărare revin altor celule. Astfel, macrofagele, în special cele activate, pot avea activitate tumoricidă sau reglatoare a reacţiilor de apărare. Cele tumoricide pot distruge celula tumorală chiar atunci când se află într-un raport mic cu acesta (1:1). Ele pot realiza protecţia atât faţă de tumora indusă experimental, cât şi faţă de tumora spontană.

În afară de efectul citotoxic direct, macrofagele pot inhiba proliferarea tumorală prin efectul lor citostatic sau prin funcţiile lor secretorii care le permit sinteza şi eliberarea unor produse nocive, cum ar fi factorul de necroză a tumorilor (TNF), sau a unor monokine cu rol major în declanşarea şi stimularea funcţiilor imune ale limfocitelor, cum este cazul IL-1. Ca şi în cazul limfocitelor *T*, efectul macrofagelor asupra tumorilor este extrem de complicat şi puţin înţeles. Ele pot bloca tumora, o pot ucide, dar pot secreta şi factori de creştere care stimulează proliferarea

celulelor tumorale, angiogeneza şi deci irigarea tumorii. Prin unele monokine, pot supresa unele funcţii ale limfocitelor. Se pare că, chiar funcţia citotoxică a lor este dependentă şi influenţată de o serie de factori încă necunoscuţi. Unele studii experimentale semnalează faptul că tumorile transplantate sau induse nu sunt rejectate de către animalele de experienţă care sunt lipsite de macrofage cu funcţie citotoxică. Alte studii însă constată că macrofage citotoxice există atât la şoarecii care pot elimina tumora cât şi la cei la care aceasta se dezvoltă nestânjenit. Aceste constatări pun sub semnul întrebării rolul funcţiei citotoxice a macrofagelor în apărarea antitumorală.

Alţi efectori ai imunităţii antitumorale sunt limfocitele *NK*, o populaţie de celule considerată ca făcând parte din "prima linie de apărare", deoarece pot ucide spontan, nespecific dar selectiv celulele modificate viral sau deviate neoplazic, limfocitele LAK, celulele efectoare ale citotoxicităţii ADCC, precum şi unele citokine cum ar fi limfotoxinele, TNF etc.

## FACTORI CARE POT FAVORIZA DEZVOLTAREA TUMORII

Organismul dispune de atâtea mijloace de apărare antitumorală încât apariţia şi dezvoltarea acesteia pare un adevărat miracol. Cu toate acestea, celula tumorală reuşeşte să depăşească şi să înfrângă efectorii imunităţii, sfârşitul fiind letal pentru gazda în care s-a dezvoltat procesul neoplazic. De fapt, boala neoplazică ar fi benignă dacă tumora nu ar metastaza. Gravitatea ei, bineînţeles cu unele excepţii, nu este dată nici de dimensiunea tumorii primare, nici de localizare, ci de difuzibilitatea ei, de capacitatea ei de a se "transplanta" la distanţă, de a se "împrăştia" în tot organismul, prin contiguitate sau prin vasele sangvine sau limfatice. De aceea, poate calea cea mai raţională de combatere a cancerului ar fi suprimarea potenţialului de metastazare a tumorii. Unele tumori sunt mai metastazante decât altele, iar în cadrul aceleiaşi formaţii proliferative, unele celule au o abilitate de metastazare mult mai mare decât altele. Pentru diseminare, celula metastazantă trebuie să se desprindă de tumora "mamă", să pătrundă printre alte celule normale, să traverseze peretele vaselor sangvine sau limfatice, să supravieţuiască în torentul circulator, să se ataşeze la alte ţesuturi şi să prolifereze. Pentru realizarea acestor condiţii, ea trebuie să nu exprime sau să exprime slab determinanţii antigenici, să-i mascheze, să sintetizeze sau să folosească diferite enzime ca de pildă colagenaze, activatori de plasminogen etc., să exprime molecule de adeziune şi să evite atacul celulelor ucigaşe inhibându-le funcţional. La noul loc de dezvoltare, tumora metastazată este dependentă de angiogeneză, motiv pentru care tumorile solide produc un număr mare de factori angiogenici care vor stimula proliferarea capilarelor nou formate, în vederea realizării rapide a unei reţele dezvoltate de vase necesare pentru aprovizionarea cu oxigen şi factori nutritivi. Se pare că angiogeneza însoţeşte sau chiar precede procesul de malignizare, iar limitarea sau blocarea extinderii vaselor de neoformaţie ar opri creşterea tumorii. De aceea, moleculele produse de către celulele normale, care pot bloca angiogeneza, ar fi utilizabile potenţial în terapia antitumorală (tabelul 111). De asemenea, ele ar putea anula efectul unor molecule secretate de către tumoră, care stimulează angiogeneza (tabelul 112).

*Tabelul 111*

**Inductori şi activatori ai neovascularizării in vivo (după N.Bouck)**

| Grupa de produse (structură chimică, funcţii) | Produsul |
|---|---|
| Factori de creştere sau alţi factori | Factorul de creştere a fibroblastelor<br>Factorul de creştere a celulelor epidermale<br>Interleukina - 1$\alpha$<br>Factorul de necroză a tumorilor $\alpha$<br>Factorul de creştere a celulelor endoteliale derivat din trombocite<br>Factorul de permeabilizare a vaselor |
| Alte proteine | Angiotensina II<br>Angiogenina<br>Activatorul de plasminogen<br>Ceruloplasmina<br>Poliamine |
| Substanţe neproteice | Nicotinamida<br>Adenozindifosfatul (ADP)<br>Prostaglandinele $E_1$ şi $E_2$<br>Heparina<br>Selenium ($10^{-7}$ M)<br>1- butiril - glicerolul<br>Lactaţii |

În afară de angiogeneză, sunt şi alţi factori care favorizează matastazarea tumorii şi proliferarea ei. Este cazul moleculelor de adeziune care ar favoriza ataşarea unor enzime, al diferiţilor factori care permit mascarea determinanţilor antigenici, al modulaţiei antigenice etc. Unele molecule, ca de pildă *sialomucina,* sunt prezente constant pe membrana celulei tumorale, pe de o parte mascându-i determinanţii antigenici, iar pe de altă parte dereglând posibilitatea de ataşare a celulelor citotoxice, până la anularea aderării lor la ţintă.

Tratarea celulelor tumorale cu neuraminidază favorizează formarea de conjugate între acestea şi limfocitele *T,* deoarece această enzimă degradează sialomucinele. Efect "blocant" asupra antigenicităţii tumorii au şi anticorpii sau complexele antigen-anticorp care ar "masca" epitopii celulelor tumorale, iar prin fragmentul *Fc* ar bloca receptorii *Fc* ai celulelor *LAK.* De asemenea, anticorpii anti-tumoră ar activa "modularea antigenică", stimulând "internalizarea" sau "raderea" antigenelor tumorale de pe suprafaţa celulei neoplazice, facilitând astfel "fofilarea" şi difuzarea în tot organismul a tumorii scăpate, evadate, de sub controlul sistemului imun. Aşadar, modificările de la nivelul membranei plasmatice a celulei maligne îi creează un potenţial particular de difuzibilitate, supravieţuire şi multiplicare. Celulele cu o mare capacitate de metastazare, exprimă gene similare oncogenelor, au pe suprafaţa lor molecule şi structuri cu proprietăţi similare receptorilor pentru factori de creştere, pot penetra uşor în vasele sangvine şi pot evita atacul celulelor citostatice, scăpând de sub supravegherea imună.

*Tabelul 112*

**Inhibitori ai procesului de neovascularizare in vivo (după N.Bouck)**

| Caractere chimice, funcţii | Produsul |
|---|---|
| Inhibitori enzimatici | Inhibitorii ribonucleazei placentare<br>Inhibitori ai sintezei prostaglandinelor (indometacin, aspirină etc.)<br>Inhibitori ai metaloproteinazelor |
| Fragmente de proteine | Trombospondina (o glicoproteină de 140 kD)<br>Peptide derivate din laminină |
| Modulatori ai metabolismului colagenului | Analogi ai prolinei<br>$\alpha, \alpha$ - dipiridil<br>$\beta$ - aminoproprionitril |
| Alţi factori | Steroizi angiostatici<br>Protamine<br>Retinoizi<br>Factorul IV trombocitar<br>Metotrexat<br>D - penicilamina |

## RELAŢIA TUMORĂ - SISTEM IMUN

Observaţia, că tumorile care sunt puternic metastazante sunt slab infiltrate cu limfocite, ar sugera că răspunsul imun specific ar avea un rol major în controlul difuzibilităţii şi proliferării lor şi, deci, în controlul bolii neoplazice. Deşi la om este încă greu de demonstrat existenţa unui răspuns imun specific antitumoral, totuşi, unele observaţii clinice sugerează că mijloacele de apărare imună ar juca un rol important în controlul proliferării tumorilor *in vivo*. S-a observat, de exemplu, o creştere a metastazării la pacienţi cu imunosupresie generală, la cei cu supresie funcţională a limfocitelor *T* sau a celulelor *NK*, în caz de disfuncţii ale macrofagelor etc. Toate acestea pledează pentru existenţa unor componente ale sistemului imun cu rol în controlul procesului neoplazic. Probabil că în reacţiile imune antitumorale, ca de altfel şi în cele declanşate de către antigenele microbiene sau alogrefe, celula prezentatoare de antigen exprimă molecule costimulatoare (*B*7) care, împreună cu moleculele *CD*28 de pe limfocitele *T* h, contribuie la adeziunea *APC-T* h şi la recunoaşterea specifică a epitopilor de către *T* h prin receptorii săi pentru antigen. În lipsa *B*7 sau *CD*28, se instalează o anergie a celulelor *T* şi, deci, toleranţa imunologică faţă de tumoră. Această toleranţă ar putea fi favorizată şi de o exprimare slabă a antigenelor *MHC* de clasa II sau de imposibilitatea de sinteză a unor citokine care să transmită semnale activatoare către limfocitele *T* citotoxice ($CD8^{+}$).

Încă la sfârşitul deceniului şase al acestui secol, când nu se cunoştea existenţa celulelor *NK*, *LAK*, a limfokinelor, când nu se ştia nimic despre rolul *MHC* în rejecţia

alogrefelor, a fost formulată o teorie cunoscută sub denumirea de "teoria supravegherii imune", conform căreia sistemul imun al organismului ar recunoaşte şi elimina celulele transformate neoplazic, eliminare care ar avea loc permanent, deoarece din populaţia de celule normale ale organismului ar apărea zilnic cca. $1 \cdot 10^3$ mutante care se diferenţiază neoplazic spontan şi care au antigene recunoscute ca străine de către organism. Această diferenţiere neoplazică are loc la toţi indivizii speciei umane, supravieţuind numai cei care pot dezvolta un răspuns imun eficient, adică numai cei la care supravegherea imună funcţionează corect. Conform acestui concept, rejecţia alogrefelor de ţesut normal ar fi de fapt exprimarea unui potenţial de supraveghere anti-neoplazică, potenţial care s-a dezvoltat în cursul evoluţiei filogenetice. Altfel spus, la început au apărut mijloacele de supraveghere antineoplazică ce vizau eliminarea elementelor străine de organism generate în interiorul acestuia, adică mutantele neoplazice, ulterior aceste mijloace fiind folosite şi pentru eliminarea non-propriului exogen, respectiv a celulelor sau ţesuturilor străine de organism, ajunse accidental în intimitatea ţesuturilor acestuia.

Validitatea postulatelor acestei teorii este încă discutabilă. Pe baza ei, iniţial se afirma că: *a)* celulele tumorale se formează zilnic în organism datorită mutaţiilor; *b)* mutantele au antigene specifice; *c)* sunt recunoscute şi omorâte de către efectoarele imunităţii care supraveghează în permanenţă apariţia şi evoluţia lor; *d)* diminuarea din diferite cauze a potenţialului de supraveghere imună permite apariţia bolii neoplazice.

Ulterior, conceptul a suferit unele modificări, în sensul că se afirmă că: *a)* celulele cu caracter neoplazic apar accidental în organism, cu o frecvenţă extrem de redusă; *b)* ele pot avea sau nu pot avea determinanţi antigenici proprii; *c)* rata redusă de devieri neoplazice nu face necesară existenţa unei supravegheri imune sau intervenţia unui sistem natural de rezistenţă.

Adepţii acestui concept îşi bazau afirmaţiile pe faptul că frecvenţa apariţiei tumorilor spontane nu este mai mare atunci când rezistenţa naturală şi supravegherea imună sunt absente sau compromise. La un moment dat, aceste argumente păreau plauzibile şi aveau chiar şi un suport experimental, respectiv faptul că şoarecii atimici, lipsiţi de limfocite *T* şi incapabili de rejecţia de alogrefe (şoarecii *Nu/Nu*), nu dezvoltau deloc tumori spontane. Dar, ulterior s-a dovedit că aceste animale au foarte dezvoltate funcţiie *NK*, celule care recunosc şi ucid spontan tumorile. Descoperirea celulelor *NK* şi ulterior a celor *LAK* a revalidat întrucâtva teoria supravegherii imunologice, susţinută de altfel şi de numeroase observaţii empirice privitoare la relaţiile care se stabilesc între imunodepresie sau stimularea nespecifică a răspunsului imun şi boala atumorală.

Este cunoscut faptul că diferite forme de stres pot provoca depresii ale funcţiilor imune, favorizând apariţia tumorilor primare şi metastazarea lor. Un factor de stres este "şocul", în cursul căruia au loc activarea sintezei la nivel celular a unor "proteine de şoc termic" (HSP = heat shock proteins") şi inhibiţia sintezei altor proteine normale. Sinteza HSP poate avea loc şi în alte condiţii de stres, cum ar fi cele provocate de infecţiile virale, de intoxicaţiile cronice, inflamaţii cu eliberarea de către granulocite a unor cantităţi mari de radicali liberi de oxigen, intervenţia unor inhibitori ai metabolismului energetic, sinteza anormală a unor neuropeptide etc.

Proteinele din familia HSP joacă un rol fundamental în protecţia celulelor faţă de unele semnale generate de factorii de stres, dar în aceste condiţii este modificată exprimarea echilibrată a funcţiilor proto-oncogenelor *c-fos* şi *c-myc* care deţin un rol cheie în biologia celulelor normale. Mai mult, datorită localizării

lor în nucleu, produsele acestor gene sunt implicate în reglarea şi exprimarea funcţională a altor gene ale căror produse acţionează ca mediatori finali ce intervin în transmiterea unor semnale inter- şi intracelulare. HSP deregleazā funcţia acestor gene, inducând, în decurs de cca. 30 de minute de la expunerea celulelor la temperaturi de 42 - 43° C, o creştere a nivelului ARN *c-fos* şi o scădere a ARN *c-myc*.

Aşadar, proto-oncogenele nucleare joacă un rol important în exprimarea funcţiilor imune în condiţii de stres. Dereglările la acest nivel pot duce la grave turburări şi implicit la proliferări neoplazice, constatate de altfel destul de frecvent după intervenţia unor factori de stres fizici, chimici, biologici sau sociali.

Dar, nu numai funcţiile proto-oncogenelor sunt influenţate de către factorii stresanţi. În şoc nervos, în urma intervenţiilor intempestive ale unor agenţi chimici sau fizici, se pot instala grave dereglări neuroendocrine care deprimă unele funcţii imune şi favorizează apariţia tumorilor spontane. În afară de aceste date, care confirmă rolul funcţiilor imune în prevenirea sau limitarea proceselor neoplazice, mai sunt şi alte observaţii. De exemplu, sindromul de deficit dobândit al imunităţii mediate celular (AIDS), generat de virusul HIV care distruge cu predilecţie limfocitele *T*, este de regulă asociat clinic cu sarcomul Kaposi, o tumoră cutanată care nu apare la persoanele tinere ci numai la vârstnicii cu deficit imun. În cazuri de AIDS, sarcomul Kaposi apare generalizat şi la adulţii de 20 - 40 de ani. Iradierile accidentale sunt urmate de apariţie în masă a tumorilor solide sau leucemiilor.

Deficitele imune, uneori inaparente clinic, duc mai devreme sau mai târziu la instalarea bolii canceroase. Se ştie că, practic, toţi oamenii sunt purtători ai virusului herpetic, dar numai o foarte mică parte dintre ei prezintă forme acute de boală care apar de reglulă după expunerea la ultraviolete (care favorizează exprimarea limfocitelor *Ts*), după stări grave de oboseală sau după intervenţia altor factori de stres. La aceşti subiecţi există un deficit al funcţiilor *T* şi *NK*, manifestat în special în perioadele de remisie a manifestărilor clinice ale bolii. În cazul unor deficite imune grave, care din păcate nu sunt bine cunosute de către clinicieni, apare zona-zoster, extinsă pe diverse suprafeţe ale corpului, cu prinderea filetelor nervoase. După un număr de ani, aceşti pacienţi devin canceroşi într-un procent apreciabil, dar rareori se face asocierea dintre zona-zoster, ca expresie a deficitului imun, şi boala neoplazică.

Un alt argument în favoarea existenţei unei relaţii strânse între funcţiile imune şi neoplazie este dat de către terapia imunomodulatoare care, de regulă, influenţează pozitiv evoluţia bolii. Puţini ştiu că de fapt boala canceroasă nu apare spontan, deşi se numeşte "tumoră spontană". Este adevărat, prezenţa tumorii este descoperită brusc şi în majoritatea cazurilor accidental dar, atunci când este descoperită, ea de fapt evoluează de multă vreme, din mutanţa iniţială multiplicându-se milioane de celule "fiice".

În realitate, apariţia ei este "anunţată" din timp, dar, din păcate, puţini dintre noi putem să-i recepţionăm mesajele care, la început, sunt din sfera funcţiilor imune. Într-un prim stadiu pot apărea dereglări neuroendocrine manifestate prin tulburări în sinteza unor endorfine, hormoni etc., exprimate clinic prin stări de "oboseală" nejustificată, prin depresii psihice nemotivate, adinamism, dereglări menstruale, etc. Urmează o fază de susceptibilitate la diferite infecţii virale, bacteriene sau fungice, exprimată clinic prin herpes repetat, stafilococii, infecţii "a frigore" ale căilor respiratorii superioare, micoze etc. Desigur că acest tablou este diferit de la subiect la subiect, dar în linii generale este asemănător. În aceste faze, intervenţiile prompte cu imunomodulatori pot bloca apariţia procesului neoplazic. De exemplu, sunt multe femei care au suferit intervenţii chirurgicale pe sân pentru

carcinoame mamare sau pentru simple "mastoze chistice" şi care, după ani de zile de sănătate perfectă, constată recidiva tumorii şi chiar metastaze pulmonare sau osoase, fiind definitiv condamnate. Dacă ar fi recepţionat din timp "mesajele" imunodepresiei, ar fi putut evita situaţia dramatică prin stimularea funcţiilor imune cu ajutorul imunomodulatorilor.

**Conceptul actual în terapia antitumorală** ilustrează în fond ignoranţa noastră în acest domeniu. HYOPOCRATE, încă acum două milenii şi jumătate, spunea că actul terapeutic trebuie înainte de toate să nu fie vătămător (primum non nocere = mai întâi să nu vatămi). Medicaţia antitumorală actuală este departe de a respecta acest precept de o nebănuită profunzime, limitându-se, în linii mari, la trei modalităţi terapeutice: intervenţia chirurgicală (în cazul tumorilor solide), radioterapia şi chimioterapia. Toate aceste procedee de fapt se adresează în exclusivitate tumorii pe care încearcă s-o neutralizeze, nici una dintre ele neţinând cont de potenţialul de apărare imun, pe care uneori chiar îl deprimă. De exemplu, citostaticele sau radioterapia generalizată ţintesc blocarea multiplicării celulei maligne, dar secundar ele reduc uneori până la anulare capacitatea de apărare imună, favorizând de fapt neoplazia. Este o situaţie oarecum asemănătoare celei în care cineva încearcă să omoare cu o măciucă un şobolan care a ajuns şi s-a ascuns într-un car cu oale. Lovind orbeşte în dreapta şi în stânga, nu ştie dacă are şanse să nimerească şobolanul, dar sigur distruge cea mai mare parte dintre oale. Radioterapia şi chimioterapia supresoare sunt "măciuci" care lovesc orbeşte şi care de foarte multe ori fac mai mult rău decât bine. Respectarea dictonului *primum non nocere* este discutabilă şi în alte situaţii. De pildă, în fazele mai avansate ale bolii, bolnavii de cancer prezintă anemii accentuate, motiv pentru care li se recomandă medicaţie pe bază de ioni de Fe. Or, se ştie că atât celulele prokariote cât şi cele eukariote care sunt capabile de multiplicare activă, cum ar fi bacteriile sau celulele embrionare şi neoplazice, au nevoie de energie. O parte din această energie este furnizată de către ionii de Fe care sunt elementul cu cele mai multe valenţe: $Fe^{2+}$ şi $Fe^{3+}$, valenţele cele mai comune, dar şi $Fe^{1+}$ şi $Fe^{5+}$, jocul acestora eliberând energie. Pentru captarea ei, organismul este înzestrat cu transferină care poate lega ionii de Fe, iar celulele au receptori pentru transferină prin intermediul cărora leagă complexele transferină-Fe, înglobând această sursă de energie. Nu se ştie în ce măsură terapia cu ioni de Fe combate anemia celor cu boală neoplazică, dar pare foarte plauzibilă influenţa ei benefică pentru tumoră, care este stimulată în capacitatea ei de multiplicare.

Au fost încercate imunizări antitumorale cu vaccinuri preparate din celule neoplazice întregi sau lizate, inoculate ca atare sau în asociere cu adjuvanţi. Rezultatele obţinute nu au fost încurajatoare.

În prezent, se preconizează unele modalităţi de terapie care ar folosi mijloace moderne imunologice ca de pildă:

*a.* Activarea exprimării de către celulele tumorale a antigenelor MHC de clasa I care să le facă mai uşor de recunoscut şi ucis.

*b.* Stimularea exprimării genei *B*7 pe celulele prezentatoare de antigen şi a *CD*28 pe limfocitele $CD4^+$ şi $CD8^+$, în scopul activării cooperărilor celulare (*Th* şi *Tc*) care să ducă la liza tumorii de către *Tc* într-o manieră mult activată.

*c.* Inserarea de gene pentru citokine (IL-2, IL-4, IL-7, IFN, TNF, C-CSF, GM-CSF etc.) în celula tumorală, pentru ca acestea să fie produse în cantităţi mari chiar la locul tumorii de către tumora însăşi. Inflamaţiile locale rezultate ar fi fatale pentru procesul neoplazic.

Până la elucidarea teoretică a acestor probleme atât de complexe, în prezent se pare că problema bolii neoplazice trebuie abordată nu numai prin cercetări fundamentale complexe, dar şi printr-o atitudine pragmatică raţională care să încerce să ajute şi nu să împiedice potenţialul imun de apărare al organismului. Poate că cea mai corectă conduită ar fi atacarea tumorii în condiţii menajante pentru ţesuturile sănătoase şi stimularea concomitentă a funcţiilor sistemului imun cu ajutorul unor imunomodulatori eficienţi.





# DEVIAŢIILE RĂSPUNSULUI IMUN

Caracteristicile esenţiale ale efectoarelor imunităţii sunt abilitatea lor de recunoaştere şi neutralizare a factorilor străini de organism, care pot fi nocivi pentru acesta şi potenţialul lor de autocontrol care le limitează activitatea menţinând-o în limite strict necesare. Efectele negative, exercitate de către diverşi factori externi asupra organismului, pot influenţa în mod hotărâtor funcţiile biologice ale acestuia şi, implicit, mecanismele sale de apărare imună. De exemplu, carenţele proteice asociate unor dezechilibre de aport mineral sau lipidic pot genera paralizii imunologice sau răspunsuri paradoxale la stimulii antigenici normali.

De regulă, orice stimul antigenic declanşează o cascadă de reacţii imune finalizate prin eliminarea agresorului exogen sau endogen şi restabilirea funcţiilor normale ale organismului. Efectul protector al răspunsului imun reprezintă caracteristica sa dominantă care defineşte situaţia de "normal". Pentru a reacţiona corect la un stimul antigenic dat sau pentru a realiza autoprotecţia, sistemul imun îşi are dezvoltate o serie de mecanisme specifice şi nespecifice, care limitează până la anulare posibilitatea instalării unor anomalii, rămânând exprimate numai acele funcţii care au rol benefic, de lichidare a agresorilor nocivi.

Mecanismele prin care acesta îşi exercită monumentala sarcină de a realiza distincţia dintre "benefic" şi vătămător" nu sunt încă perfect cunoscute, din care cauză au fost postulate o serie de scenarii:

*a)* celulele responsabile cu prezentarea antigenului pot distinge între "propriu" şi "străin", evitând să prezinte proteinele proprii celulelor efectoare ale imunităţii;

*b)* celulele care ar fi capabile să reacţioneze cu componentele proprii ale organismului sunt eliminate în cursul dezvoltării ontogenice;

*c)* sistemul imun are celule specializate în limitarea sau evitarea unor deviaţii de la normal a recţiilor specifice şi nespecifice de apărare.

Cu toate acestea, uneori, apărarea imună se abate de la limitele normale în sensul, fie că nu se instalează, fie că reacţionează prea brutal sau greşit orientat. Ar exista următoarele direcţii principale de evoluţie anormală a răspunsului imun:

*1.* Lipsă de răspuns, exprimată prin "toleranţă", adică prin "acceptarea" elementului străin sau, în cazuri dramatice, prin "paralizie imunologică". Toleranţa faţă de antigenele străine recunoscute ca atare de către efectoarele sistemului imun, sub restricţie MHC, poate fi definită din punct de vedere operaţional ca o acceptare pe termen lung a acesteia, iar din punct de vedere funcţional, ca o lipsă de răspuns specifică a limfocitelor *B* sau *T* helper (toleranţă la antigenele asociate cu moleculele MHC de clasa a II-a) sau *T* citotoxice (toleranţă la antigenele asociate cu moleculele MHC de clasa I).

2. Răspuns exagerat, cu o intensitate care depăşeşte cu mult limitele fiziologice şi care antrenează diferite populaţii moleculare şi celulare, care prin "explozia" lor funcţională devin nocive pentru organism (reacţii de "hipersensibilitate").

3. Reacţii de autoagresiune, de autodistrugere, ca urmare a recunoaşterii ca străine a propriilor structuri antigenice. Acestea, cunoscute şi sub denumirea de "reacţii autoimune" sau "autoimunitate", nu se deosebesc de cele normale decât prin orientarea lor, acţionând prin mecanisme comune funcţiilor normale ale imunităţii, dar nu împotriva agresorilor străini, ci împotriva propriului organism.

În prima situaţie este vorba de o inhibiţie sau de o anulare a răspunsului imun, în cea de a doua de o exagerare, iar în ultima, de o orientare greşită a lui.

## TOLERANŢA IMUNOLOGICĂ

P.EHRLICH, la începutul acestui secol, a lansat ideea că organismul are "oroare de autodistrugere" ("horror autotoxicus"), fiind capabil că facă distincţia dintre structurile proprii, pe care le tolerează, şi cele străine, pe care le respinge. În anii următori, s-a constatat că, în anumite condiţii, există situaţii în care organismul nu respinge ci acceptă elementele străine.

Dintre condiţiile care favorizează acest proces au fost semnalate următoarele:
- inocularea la persoanele adulte a unor doze mari de antigen;
- inocularea de doze normale de antigen la organismele aflate în stadiul embrionar de dezvoltare.

În anul 1945, R.A. OWEN semnalează un fapt care aparent contravenea conceptului lui P.EHRLICH. Două viţele gemene, dar cu genotipuri diferite, aveau fiecare în circulaţie, în afară de hematiile proprii, şi hematii provenite de la sora geamănă, fără a exista nici o tendinţă de eliminare a lor. Era o situaţie paradoxală, de acceptare ca proprii, a unor elemente străine de organism. Deoarece celulele aparţineau la două genotipuri diferite, OWEN denumeşte acest fenomen "himerism" şi consideră instalarea lui ca o consecinţă a circulaţiei sangvine realizată printr-o placentă unică. Aproximativ în acelaşi timp, R.F. BILLINGHAM, L..BRENT şi P.B.MEDAWAR inoculează la embrioni de şoarece aparţinând unei tulpini consangvine, să-i zicem tulpina "X", limfocite preluate de la şoarecii aparţinând altei tulpini consangvine "Y". La vârsta adultă, şoarecii "X" inoculaţi cu limfocitele şoarecilor "Y" acceptă grefa de piele aparţinând şoarecilor "Y", dar nu şi grefele de piele provenite de la alte tulpini de şoarece. Şoarecii "X" neinoculaţi prenatal cu limfocitele şoarecilor "Y" au respins grefa de piele "Y".

Pe baza experimentelor de acest gen, s-a ajuns la concluzia că sistemul imun, în timpul dezvoltării sale ontogenice, "inventariază" antigenele cu care vine în contact, recunoscându-le ca proprii. Cele care au lipsit de la "inventariere" sunt considerate ca străine şi eliminate. În acest fel, se realizează lipsa de răspuns sau "toleranţa imunologică" faţă de antigenele proprii şi posibilitatea de a dezvolta reacţii imune faţă de cele străine. Structurile proprii organismului, care nu sunt "inventariate", sunt considerate ca străine şi, în cazul în care vin în contact cu efectoarele imunităţii, sunt eliminate. Deci, toleranţa este o stare de lipsă de răspuns specific, sau de răspuns slab, indusă prin expunerea anterioară la un antigen dat, ea putând fi generată de către orice antigen. Este antigen-specifică, organismul putând reacţiona perfect normal faţă de toate celelalte antigene, tolerându-le doar pe cele pe care le-a cunoscut în cursul evoluţiei sale ontogenice,

când le-a recunoscut ca proprii, sau pe cele care au suprimat clonele de limfocite implicate în răspunsul specific.

Faptul, că starea de toleranţă poate fi transferată de la un organism la altul prin celule dar nu prin ser, este o dovadă a intervenţiei factorilor celulari şi nu a celor umorali în instalarea ei.

Aşadar, este lesne de înţeles că alterările profunde care intevin la om sub influenţa diferiţilor factori de mediu pot fi surse potenţiale de modificări în reactivitatea imună a produşilor de concepţie, cu serioase consecinţe de ordin biologic.

În prezent se acceptă existenţa a trei mecanisme principale care ar sta la baza instalării şi persistenţei toleranţei imunologice şi care, la rândul lor, sunt condiţionate de către o serie de factori (tabelul 113) dependenţi de organismul gazdă. În linii mari, mecanismele care pot genera toleranţa sunt absenţa, blocada sau supresia activă a funcţiilor clonei de limfocite cu receptori pentru antigenul implicat.

*Tabelul 113*

**Diverşi factori care influenţează instalarea toleranţei imunologice (după J.A. Belanti)**

| |
|---|
| Imaturitatea imunologică |
| Factori genetici |
| Caracteristicile antigenului: |
| - complexitatea moleculei |
| - starea fizică a moleculei |
| - capacitatea de dispersare în organism |
| Doza de antigen |
| Persistenţa antigenului în organism |
| Calea de inoculare |

Factorii cei mai importanţi care codiţionează aceste mecanisme sunt:

*1. Vârsta.* La embrioni sau nou-născuţi, ale căror limfocite nu sunt încă mature funcţional, antigenul, în anumite doze, nu declanşează reacţii imune ci toleranţă imunologică, deoarece clona de celule ori este "sufocată", pierzându-şi ireversibil sau reversibil capacitatea sa funcţională, ori este pur şi simplu eliminată. Dacă, de exemplu, mieii în stare de dezvoltare fetală au fost inoculaţi cu un antigen oarecare, după naştere ei nu vor răspunde imun la stimulul cu acel antigen, dar vor răspunde faţă de toate celelalte antigene. Aşa s-ar explica toleranţa la antigenele "proprii" ale organismului: limfocitele au "inventariat" tot ce era prezent şi au recunoscut ca "proprii" chiar şi acele structuri care de fapt erau străine de organism dar care erau la "faţa locului" în momentul "inventarului". Un fel de "pui de cuc în cuib străin". Clona de celule cu receptori specifici pentru aceşti determinanţi îşi pierde receptorii, nu mai "vede" determinanţii şi devine "mută", fiind represată funcţional pentru toată viaţa, în cazul antigenelor proprii, sau pentru o perioadă variabilă de timp în cazul celor non-proprii.

*2. Absenţa clonei antigen-reactive (deleţie).* Eliminarea clonei limfocitare cu receptori specifici pentru un determinant antgenic este urmată de toleranţă imunologică. De exemplu, dacă se iradiază letal şoareci care sunt apoi reconstituiţi cu o populaţie de limfocite, din care prin cromatografie de afinitate a fost

îndepărtată clona respectivă, animalele reconstituite devin tolerante pentru antigenul recunoscut de către clona eliminată. Acelaşi mecanism intervine şi atunci când antigenul este asociat cu o toxină sau cu izotopi radioactivi; inoculat, el va transporta la celulele cu receptori specifici pentru el otrava sau izotopii, care o vor distruge. Animalele astfel tratate vor răspunde normal la toţi ceilalţi stimuli, în afară de cel pentru care nu mai au celule. Eliminarea (deleţia) clonei de limfocite este unul dintre principalele mecanisme prin care se realizează toleranţa în timpul maturării precursorilor celulari în organele limfoide primare şi în special în timus.

*3. Complexitatea moleculei de antigen.* Substanţele cu o configuraţie simplă şi cu o greutate moleculară mică, care pot persista mult timp în organism, sunt mai tolerogene decât cele cu molecula complexă.

*4. Starea fizică a moleculei de antigen.* Polimerii moleculari sunt buni imunogeni, iar monomerii, buni tolerogeni. De exemplu, molecula de IgG în forma sa monomeră poate induce toleranţă, dar atunci când polimerizează nu mai este tolerogenă. De aici concluzia că, în cazul administrării în scop terapeutic de gammaglobuline, este indicat ca moleculele să fie administrate sub formă monomeră şi nu polimeră, pentru a nu stimula reacţii imune faţă de ele.

*5. Doza de antigen* are un rol covârşitor. Există toleranţă de "zonă joasă" sau de "zonă înaltă", instalate consecutiv inoculărilor voite sau accidentale a unor doze mici sau mari de antigen (fig. 205). Toleranţa de "zonă joasă" poate fi indusă de către un număr mic de antigene şi interesează în exclusivitate limfocitele *T* deoarece ea activează funcţiile celulelor *T* supresoare (*T*s). Toleranţa de "zonă înaltă", prin exces de antigen, poate interesa ambele populaţii de limfocite *T* sau *B* şi poate fi realizată de majoritatea antigenelor. Limfocitele *T* pot deveni tolerante la doze de antigen de 100-1 000 de ori mai mici decât limfocitele *B*, la care chiar şi viteza de instalare a toleranţei este mai lentă: în decurs de ore în cazul limfocitelor *T* şi de zile în cel al limfocitelor *B*.

*6. Persistenţa antigenului* este o altă condiţie esenţială. Antigenele solubile induc răspuns imun dacă sunt inoculate intradermic împreună cu un adjuvant, dar pot deveni tolerogene atunci când sunt inoculate pe cale intravenoasă. Este posibil ca, de fapt, nu calea de administrare să determine aceste reacţii diferite, ci tot doza de antigen. Intradermic nu se poate inocula decât o cantitate limitată,

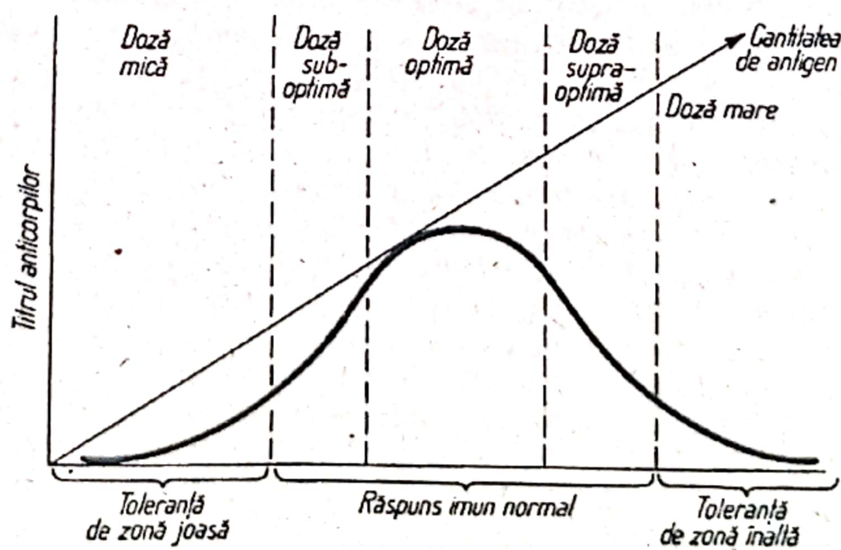



Fig.205. Relaţia dintre doza de antigen şi toleranţa imunologică. "Toleranţa de zonă joasă" se instalează consecutiv inoculării unor cantităţi mici de antigen, iar cea de "zonă înaltă" după inoculul de doze mari de antigen. Doza optimă induce răspuns imun normal.

pe când intravenos se pot inocula cantităţi mari care facilitează instalarea toleranţei de "zonă înaltă".

Spre deosebire de "paralizia imunologică" sau imunosupresie, unde lipsa de răspuns este generală, interesând toate clonele de limfocite (policlonală), toleranţa, ca şi reacţia imună normală, se caracterizează printr-un înalt grad de specificitate. Limfocitele *T* şi eventual şi cele *B* pot fi tolerante pentru un singur epitop şi reactive pentru toţi ceilalţi determinanţi antigenici existenţi în natură.

În linii generale, această stare de reactivitate a organismului se caracterizează prin următoarele:

*a.* Nu este transmisibilă genetic ci dobândită somatic. Organismul poate deveni tolerant faţă de un epitop oarecare pentru un anumit timp, dar nu transmite şi nici nu recepţionează în linia sa germinativă acest atribut.

*b.* Este "cantitativă" şi nu "calitativă". Acceptarea elementelor străine poate lipsi cu desăvârşire şi atunci se declanşează reacţiile imune, sau poate fi prezentă şi atunci se instalează lipsa de răspuns pentru o durată mai lungă sau mai scurtă de timp. De fapt, toleranţă absolută nu există, deoarece în stare "latentă" mai există unele limfocite capabile să declanşeze reacţii imune chiar faţă de ţesuturile organismului propriu. Aşa s-ar explica apariţia unor reacţii autoimune. Numărul mic al acestor celule, slaba exprimare a receptorilor de membrană pentru antigenele proprii şi intervenţia diverşilor factori supresori determină areactivitatea lor.

*c.* Este reversibilă, dispărând o dată cu factorii care au favorizat inducerea sau menţinerea ei (persistenţa antigenului, refacerea clonei, intervenţia unor produse supresoare sau citotoxice etc.). Acest caracter are o deosebită importanţă practică în sensul că, prin normalizarea unor condiţii de microclimat, se pot redresa situaţii care par a fi ireversibile.

*d.* Poate fi realizată printr-o simplă "claustrare" a antigenelor, care devin inaccesibile sistemului imun. Spermatozoizii, mielina din ţesutul nervos, unii hormoni etc. sunt perfect izolaţi de restul organismului, izolare care permite coexistenţa lor cu sistemul imun. În cazul unor eliminări accidentale a barierelor izolatoare se declanşează reacţii imune de respingere a antingenelor respective.

Lipsa răspunsului imun specific poate fi indusă nu numai neonatal, la organismele imature imunologic, dar şi la adulţii imunocompetenţi. În general, datorită limfocitelelor *B*, inducerea areactivităţii la imaturii imunologic este mai uşor de realizat decât la adulţi.

Pot deveni tolerante atât limfocitele *T* cât şi cele *B*, dar căile de inducere şi susceptibilitatea acestor două clase de celule sunt diferite; limfocitele *T* devin uşor tolerante nu numai în cursul dezvoltării lor ontogenice dar şi la maturitate, pe când limfocitele *B* pot deveni tolerante în ontogenie dar nu şi atunci când devin mature funcţional. Mai exact, cu cât celulele *B* au evoluat pe linia maturării lor cu atât devin mai greu areactive, doza de antigene timo-independente sau timo-dependente necesară pentru realizarea acestei situaţii trebuind să fie din ce în ce mai mare. Se apreciază că, pentru a deveni tolerante, limfocitele *B* mature necesită doze de antigen de 100 de ori mai mari decât cele tinere. Relaţia existentă între susceptibilitatea la toleranţă şi gradul de maturitate a celulelor *B* (tabelul 114) influenţează şi căile posibile de inducere a ei (tabelul 115). Acestea nu sunt bine cunoscute, dar se pare că sunt multiple şi că nu se exclud mutual. Ele ar acţiona fie prevenind proliferarea sau diferenţierea celulelor *B*, fie blocând secreţia de imunoglobulină, generarea celulelor de memorie sau comutarea spre alte clase de imunoglobulină.

*Tabelul 114*

**Susceptibilitatea la toleranţă a limfocitelor B de şoarece în relaţie cu gradul lor de maturitate (după D.W. Scott)**

| Gradul de maturare a celulelor | Fenotip | | | Susceptibilitatea la toleranţă |
|---|---|---|---|---|
| | IgM | IgD | Ia | |
| Pre-*B* | - | - | - | Rezistent |
| *B* timpuriu | + | - | - | Sensibil |
| *B* imatur | + | ± | ? | Sensibil |
| *B* matur | + | + | + | Rezistent |

Limfocitele *B* pot tolera atât antigenele timo-dependente cât şi antigenele timo-independente. Spre deosebire de ele, limfocitele *T* devin tolerante numai faţă de antigenele timo-dependente. Deşi efectul este acelaşi, mecanismele de instalare a toleranţei la aceste două clase de celule este fundamental diferit. În cazul limfocitelor *B*, ar exista patru modalităţi majore de inducere a ei (fig. 206). Este cazul "eliminării" clonei de celule *B* de către un antigen cu care această celulă a venit în contact şi care era în doze necorespunzătoare, al "pierderii funcţiei" ca urmare a imposibilităţii de a primi semnale ajutătoare de la celulele *Th*, sau prin blocarea acesteia de către concentraţiile mari de antigen. Faptul, că în

*Tabelul 115*

**Căi posibile de inducere a toleranţei la nivelul limfocitelor B (după D.W.Scott)**

| |
|---|
| *a.* Imposibilitatea de a resintetiza receptorii modulaţi |
| *b.* Blocarea transmisiei semnalelor intracelulare |
| *c.* Blocarea receptorilor pentru antigen sau pentru citokine |
| *d.* Lipsa semnalelor generate de către receptorii IgD |
| *e.* Interferenţe funcţionale cu receptorii pentru interleukine sau factori mitogeni |
| *f.* Imposibilitatea cooperării cu macrofagele |
| *g.* imposibilitatea primirii semnalului II costimulator, eliberat de macrofage, limfocitele T sau LPS |
| *h.* Moartea celulelor aparţinând clonei reactive pentru un antigen |

prezenţa limfocitelor *Th* celulele *B* nu mai pot fi făcute tolerante, a generat părerea că potenţialul tolerogen al antigenului depinde în mare măsură de imunogenitatea grupării sale purtătoare. În realitate, însă, natura moleculară a antigenului este mai importantă decât imunogenitatea sa. De exemplu, celulele *B* ale şoarecilor nou-născuţi pot deveni tolerante la gammaglobulina umană sau albumina serică bovină. În primul caz, toleranţa este instalată ca urmare a eliminării (deleţiei) clonelor de celule *B* incompetente imunologic, iar în cazul albuminei ea apare consecutiv generării de limfocite *Ts* specifice pentru gruparea purtătoare a acesteia. De asemenea şi macrofagelor supresoare le revine un rol important în instalarea acestui gen de areactivitate la nivelul limfocitelor *B*.

Aşadar, limfocitele *B* pot deveni tolerante prin: *a)* deleţie clonală centrală (în măduva osoasă) sau periferică; *b)* acţiunea unor factori imunosupresori;

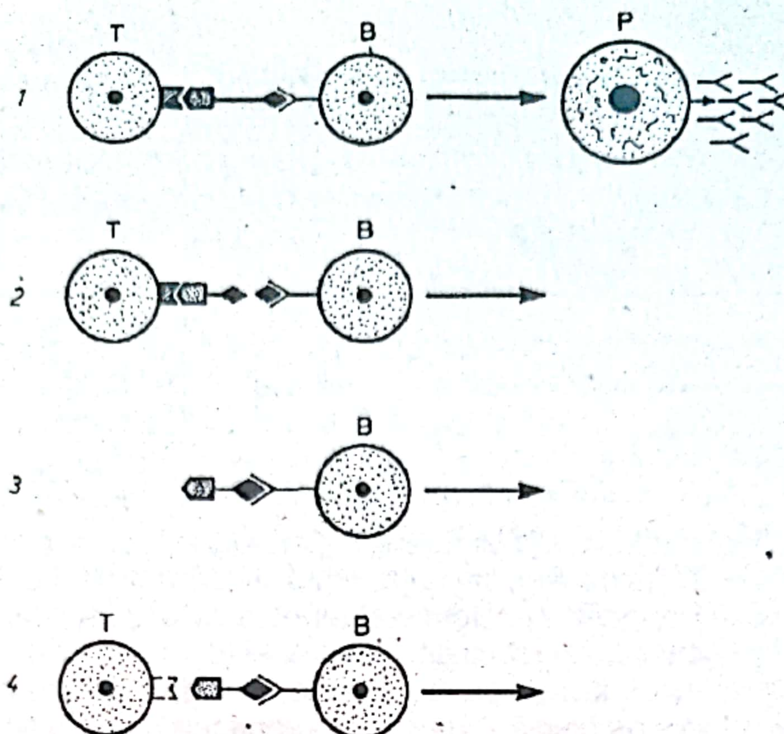



Fig.206. Inducerea toleranţei limfocitelor B la antigene timodependente.

1. Limfocitul B primeşte semnale de la limfocitul T prin puntea de antigen şi evoluează spre plasmocit.

2. Receptorul pentru antigen de pe limfocitul B sau T este blocat datorită inoculărilor repetate de doze mici sau mari de antigen.

3. Lipseşte clona de limfocite T, cu receptori pentru antigen.

4. Limfocitele T ajutătoare au devenit tolerogene. Ele posedă receptori pentru antigenul respectiv, dar nu pot reacţiona la semnalele acestora şi, deci, nu pot stimula celulele B.

*c)* absenţa limfocitelor *Th* şi *d)* blocarea idiotipului receptorilor lor de către anticorpi anti-idiotip.

În cazul limfocitelor *T*, toleranţa poate fi indusă cu uşurinţă atât la populaţiile mature cât şi la cele imature, necesitând pentru aceasta cantităţi mici de antigene, de ordinul microgramelor, în comparaţie cu limfocitele *B* care necesită pentru acelaşi scop cantităţi de ordinul miligramelor. Şi căile de inducere a ei sunt, în mare parte, diferite la celulele *T* faţă de cele *B* (tabelul 116). În cazul limfocitelor *T* mature, toleranţa poate fi instalată ca urmare a eliminării populaţiilor de celule efectoare (*T*c) sau a activării celor *T*s. De regulă, are loc eliminarea celulelor *T*h care se face mai rapid decât generarea celor *T*s şi care persistă chiar şi atunci când *T*s au fost reduse la limite normale. Se pare că toleranţa indusă prin depleţia celulelor *T* diferă, cel puţin în stadiile ei iniţiale, de cea realizată prin depleţia limfocitelor *B*, în special în ce priveşte doza şi structura antigenului utilizat în acest scop. Desigur, mai există o deosebire esenţială între aceste două populaţii de limfocite. După cum se ştie, limfocitele *B* sunt practic unifuncţionale, în sensul că au doar menirea să sintetizeze anticorpi şi eventual să fie celule antigen-prezentatoare şi reglatoare, în timp ce limfocitele *T* au funcţii diferite, cum ar fi cele ajutătore (*T*h), citotoxice (*T*c), supresoare (*T*s) etc., toleranţa putând interesa una sau alta dintre aceste subpopulaţii.

**Căi posibile de inducere a toleranţei limfocitelor (după D.W.Scott)**

| |
|---|
| *a.* Prin deficit funcţional al macrofagelor (nu pot prezenta antigenul sau nu-l pot asocia cu molecule MHC) |
| *b.* Defecte în recepţionarea celui de al II-lea semnal (IL-1) |
| *c.* Sinteza de IL-2 este absentă sau defectuoasă |
| *d.* Celula nu poate exprima receptorii pentru IL-2 |
| e. Sinteza limfokinelor activatoare este depresată |
| f. Intervenţia exagerată a unor circuite supresoare |
| g. Moartea celulelor |

După cum aminteam în capitolele anterioare, limfocitele *T*, în cursul maturării lor, devin tolerante la antigenele MHC proprii şi discriminatorii faţă de cele străine. Datele experimentale au demonstrat clar că antigenele MHC care sunt prezente în timpul dezvoltării celulei *T* sunt ulterior tolerate şi de către acestea, modelele experimentale cele mai utilizate pentru astfel de scopuri fiind inoculul de celule alogene la şoarecii nou-născuţi. Desigur, deleţia clonală a celulelor autoreactive este un mecanism major de inducere a lipsei de răspuns faţă de "propriu", ea fiind realizată de către celulele dendritice şi macrofagele derivate din măduva osoasă şi ajunse în zona medulară a timusului.

Dar nu se poate ca toate proteinele proprii să fie exprimate în timus pentru a induce "deleţia clonală", de unde concluzia că trebuie să existe şi alte mecanisme care să asigure tolerarea antigenelor proprii. De aceea se pare că, la nivelul acestui organ, eliminarea clonei nu este singurul mecanism care poate genera anularea funcţională a clonei sau clonelor de celule autoreactive. De exemplu, tratamentul cu $Ca^{2+}$ induce anergie, influxul acestor ioni fiind tolerogenic pentru celulele *T* în absenţa altor semnale. În timus, la nivelul stratului epitelial cortical, toleranţa poate fi indusă prin mecanisme non-deleţionale care constau din instalarea unei anergii şi supresii clonale realizate prin mecanisme încă necunoscute. Atât celulele corticale cât şi cele medulare ale acestui organ exprimă antigene MHC de clasa II, tolerizarea precursorilor *T* fiind condiţionată de starea lor de maturare, semnalele costimulatoare eliberate de către macrofage sau celulele dendritice activând limfocitele *T* aflate în faze avansate de maturare şi eliminându-le pe cele foarte tinere, care au reuşit să treacă de bariera corticală şi să ajungă în medulară.

În periferie, limfocitele *T* ar fi susceptibile la toleranţă imediat după ce au părăsit timusul, fie din cauza imposibilităţii de colaborare cu alte limfocite *T*, fie din cauza prezentării antigenelor de către celulele APC "neprofesionale", lipsite de liganzii esenţiali. Intervenţia unor limfokine cu rol "blocant" ar favoriza instalarea toleranţei (fig. 207).

Pot deveni tolerante limfocitele *T*h, situaţie în care efectul este exprimat în special prin intermediul celulelor *B* (nu mai are loc sinteza de anticorpi), limfocitele *T* de hipersensibilitate de tip întârziat (*T*d), cele *T* citotoxice etc. În caz de toleranţă a *T*d, de exemplu, unii subiecţi, deşi sunt bolnavi de tuberculoză, reacţionează negativ la inoculul intradermic cu PPD, fiind în mod eronat consideraţi ca indemni de această boală. Precursorii limfocitari *T*c devin toleranţi când vin în contact cu doze mari de antigen asociate cu antigenele de clasa I ale complexului MHC, iar

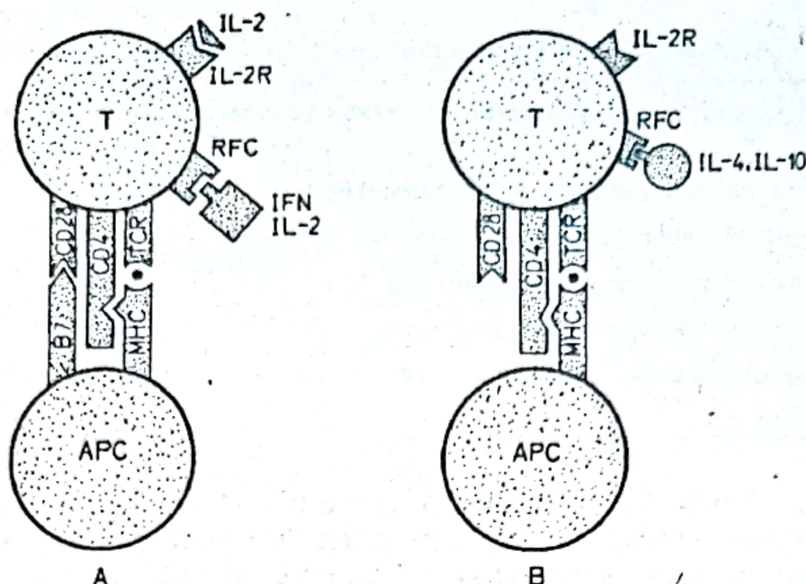



Fig.207. Model ipotetic de realizare a toleranţei limfocitelor T pentru antigenele proprii.
În situaţia A, limfocitul T devine activ deoarece aderă la celulele prezentatoare de antigen şi primeşte semnale stimulatorii de la IFN sau IL-2 prin receptorii pentru "factorii de creştere" (RFC).
B. Celulele prezentatoare de antigen (APC) nu sunt "profesionale" fiind lipsite de moleculele B7. Limfocitul T primeşte semnale numai de la IL-4 sau IL-10 (după H. Waldman şi S. Cobbold).

cei *Th* când sunt expuşi la antigene asociate cu moleculele de clasa II de MHC. În cazul intervenţiei celulelor *Ts*, se realizează o supresie antigen specifică atât la nivelul populaţiei *T* cât şi al celei *B*. După cum spuneam, limfocitele *B* pot deveni tolerante atât la antigenele timo-independete, care au o remanenţă mare în organism, mai ales atunci când sunt inoculate în doze mari, cât şi la antigenele timodependente, situaţie în care sunt implicate şi limfocitele Th.

În general, populaţia de celule *T* devine tolerantă la doze mici de antigene inoculate singure, sau asociate cu diverse preparate imunosupresoare. Dintre acestea, foarte eficientă este ciclofosfamida care are două modalităţi principale de acţiune: *a)* prin scăderea pragului inferior de realizare a toleranţei şi *b)* prin blocarea secvenţelor de diferenţiere în cursul trecerii celulelor de la celulă de memorie la celulă efectoare. De altfel, ciclofosfamida acţionează şi asupra limfocitelor *B*, inhibându-le exprimarea receptorilor de membrană pentru antigene. În afară de ciclofosfamidă, instalarea areactivităţii de acest gen mai poate fi facilitată şi de către anticorpii anti-idiotip, de serul antilimfocitar, responsabil nu numai de generarea toleranţei dar şi de imunosupresie, de corticosteroizi, de diverse substanţe citotoxice etc.

Toleranţa imunologică are efecte negative, în sensul că pune în imposibilitate organismul să înlăture substanţe care îi sunt străine, dar are şi efecte pozitive. Unul dintre acestea este însăşi tolerarea propriilor structuri care, dacă nu s-ar realiza, ar putea duce la autodistrugere prin propriile mijloace de apărare. Uneori este de dorit realizarea toleranţei imunologice faţă de anumite antigene. Este cazul reacţiilor alergice exagerat de intense, sau al unor grefe de organe sau ţesuturi a căror respingere imună constituie o piedică în terapia unor deficite fiziologice de importanţă vitală pentru existenţa organismului.

# HIPERSENSIBILITATEA IMUNOLOGICĂ

Toleranţa imunologică, această stare de areactivitate totală sau parţială, tranzitorie sau peristentă faţă de unul sau mai mulţi determinanţi antigenici, poate fi considerată ca o "deviaţie normală", atunci când este vorba de antigenele organismului propriu, sau ca o deviaţie "patologică", atunci când areactivitatea este direcţionată către antigene străine de organism.

Spre deosebire de toleranţă, reacţiile imune violente, cunoscute sub termenul generic de "alergii", definesc o "hipersensibilitate" la antigene străine de organism, dar nu şi la cele proprii organismului. Mecanismele care stau la baza reacţiilor de hipersensibilitate nu diferă fundamental de cele care definesc răspunsul imun normal; deosebirile constau doar în intensitatea manifestării şi tipul de celule care este responsabil de declanşarea lor. Spre deosebire de răspunsul imun normal, hipersensibilitatea se instalează după contacte repetate cu alergenul şi are un caracter individual: dintr-un număr mare de indivizi expuşi aceluiaşi stimul, numai unii vor dezvolta reacţii alergice (de la cuvântul grec *allos* = altfel). Principiul declanşării acestora este similar reacţiilor antigen-anticorp normale, diferind doar clasa de imunoglobuline implicată, IgE în loc de IgM sau IgG.

S-a încercat clasificarea reacţiilor de hipersensibilitate ţinându-se cont de diferite criterii, cum ar fi: natura efectorului (reacţii *mediate de anticorpi* şi reacţii *mediate celular*), timpul de declanşare a lor după contactul cu antigenul (de *tip imediat* sau de *tip întârziat* ) etc.

Ţinând cont de aceste criterii, precum şi de complexitatea manifestărilor clinice, P.G.H.GELL şi R.R.A.COOMBS au grupat reacţiile de hipersensibilitate în patru tipuri, şi anume:

1. Hipersensibilitate imediată de tip I, anafilactică sau de "tip reaginic".
2. Hipersensibilitate imediată de tip II, citotoxic-citolitică, mediată prin anticorpi.
3. Hipersensibilitate de tip III mediată de complexe imune.
4. Hipersensibilitate de tip IV sau de "tip întârziat" (tuberculinic).

Primele trei sunt mediate de către anticorpi, iar ultima de către limfocitele *T* de "hipersensibilitate de tip întârziat" ($T_d$), la care îşi pot aduce contribuţia şi macrofagele.

## HIPERSENSIBILITATEA IMEDIATĂ DE TIP I SAU "ANAFILACTICĂ"

Este provocată de către anticorpii din clasa IgE care sunt denumiţi din această cauză şi "reagine", caracteristica ei majoră fiind apariţia rapidă a leziunilor, la câteva minute după expunerea la alergen, ca urmare a fixării moleculelor IgE pe membrana mastocitelor şi granulocitelor bazofile. La un nou stimul cu acelaşi antigen, acesta se va fixa la situsul combinativ al moleculelor IgE ataşate prin fragmentul *Fc* la receptorii pentru $Fc\varepsilon$ de pe celulele mediatoare, fixare care declanşează un influx de $Ca^{2+}$, activarea fosfolipazei $A_2$ ($PLA_2$), degranularea, rezultată din fuzionarea granulelor mastocitelor cu membrana plasmocitară şi eliberarea de amine vasoactive şi spasmogene care vor provoca *urticarie, astm*

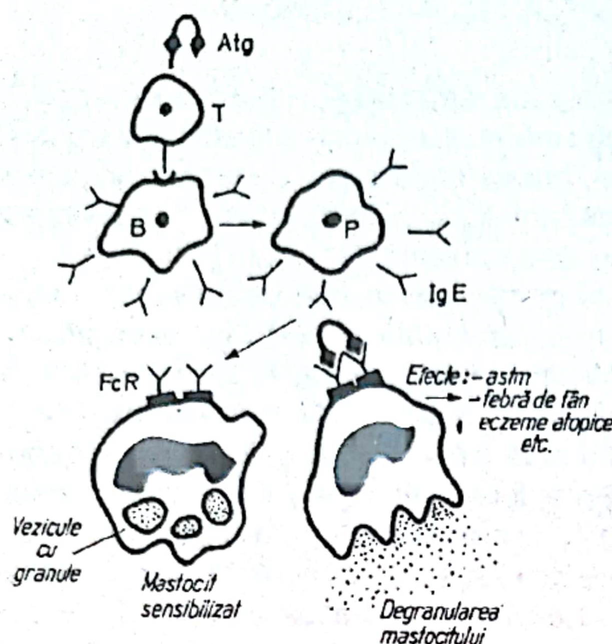



Fig.208. Modul de instalare a reacţiilor de hipersensibilitate de tip I. Antigenul stimulează limfocitele T, care vor coopera cu B şi vor antrena transformarea acestora în plasmocite secretoare de anticorpi din clasa IgE (reagine). Moleculele de IgE se fixează prin Fc la FcεR de pe membrana mastocitelor declanşând degranularea acestora şi eliberarea extracelular de mediatori solubili. Urmează instalarea simptomelor clinice (astm, urticarie etc.).

*bronşic, febră de fân, rinite, şoc anafilactic* etc. (fig. 208). De fapt, eliberarea aminelor vasoactive din celulele efectoare amintite poate fi declanşată în orice situaţie care realizează legarea încrucişată a receptorilor Fcε de pe mastocite sau bazofile şi care induc atât degranularea cât şi activarea $PLA_2$ care, la rândul ei, va activa metabolismul acidului arahidonic (v. fig. 39).

Activitatea $PLA_2$ este total dependentă de translocarea $Ca^{2+}$ din citosol către membrană, proces care are loc în 50 - 100 de secunde de la stimularea celulei. După ce receptorii sunt agregaţi, urmează un proces de fosforilare a lor cu alte molecule începând cu cea a tirozinelor, ştiut fiind că tirozinkinaza $p^{56fyn}$ şi pp $60^{c\text{-}src}$ sunt asociate cu FcεRI. Agregarea acestui receptor recrutează o tirozinkinază şi probabil o PLC-$\gamma$1, stimulând replicarea ARNm într-o manieră proteinkinază C (PKC)-dependentă.

Acest tip de reacţie se numeşte şi "anafilactică", termen folosit pentru prima dată de către Ch.RICHET şi P.PORTIER în anul 1902 şi care înseamnă "lipsă de protecţie" (*ana* = lipsă; *philaxia* = protecţie). Se mai numeşte şi "reacţie atopică", termen prin care se înţelege declanşarea unui răspuns imun anormal la stimuli antigenici normali. Este deci o reacţie antigen-anticorp în care antigenul se cuplează la anticorpul prefixat pe anumite celule cărora le activează o serie de enzime. Acestea, în condiţiile unui influx crescut de $Ca^{2+}$, vor stimula eliberarea de către celule a diverşi mediatori cum ar fi histamina, bradikinina, diverşi factori chemotactici, factori de aglutinare a trombocitelor etc. Prostaglandinele şi leucotrienele, produse ale metabolismului acidului arahidonic, contribuie la întârzierea reacţiei care, în acest caz, apare după câteva ore şi nu după câteva minute de la contactul cu antigenul.

Prima descriere a mecanismelor reacţiilor alergice au făcut-o C.W.PRAUSNITZ şi H.KÜNSTER în anul 1921 care au arătat că "reagina", un factor seric, poate transfera pasiv starea de hipersensibilitate. De-abia în anul 1966, K. ISHIZAKA şi colab. demonstrează că "reagina" este de fapt o nouă clasă de imunoglobuline, şi anume clasa IgE.

După localizarea lor, reacţiile anafilactice sunt de două feluri: *a)* locale, situaţie în care reacţia antigen-anticorp este limitată la nivelul pielii (urticarie, eczeme), bronhiilor (astm, spasm bronşic) etc. şi *b)* sistemice sau generale, când interesează toate funcţiile organismului. De exemplu, dacă se inoculează alergenul (un ser, un medicament etc.) parenteral, după un inocul secundar realizat tot parenteral, se instalează imediat vasodilataţia şi scăderea tensiunii, creşterea permeabilităţii vasculare, edem glotic, spasm bronşic, alterări respiratorii şi circulatorii

şi moarte prin "şoc anafilactic" (tabelul 117). Dacă alergenul ajunge în organism pe cale digestivă, apare "urticaria", un sindrom caracterizat printr-o uşoară stare subfebrilă şi edeme cutanate bine delimitate.

*Tabelul 117*

**Mediatori solubili eliberaţi în cursul reacţiilor de hipersensibilitate de tip I sau "reaginic"**

| Mediatorul | Eliberat de către | Efecte biologice |
|---|---|---|
| Histamina | Bazofile<br>Eozinofile | Vasodilataţia capilarelor<br>Creşte permeabilitatea capilarelor<br>Contracţia muşchilor netezi<br>Creşte secreţia de mucus<br>Provoacă edemul mucoaselor |
| Bradikinina* | Mastocite<br>Bazofile<br>Eozinofile | Vasodilataţia capilarelor<br>Creşterea lentă a permeabilităţii capilarelor |
| Hidroxitriptamina | Trombocite<br>Mastocite | Constricţia vaselor mari<br>Măreşte permeabilitatea capilarelor<br>Constrictor al muşchilor netezi |
| Factorul de activare a trombocitelor (PAF) | Mastocite<br>Bazofile | Stimulează eliberarea aminelor vasoactive de către trombocite<br>Stimulează formarea de microtrombuşi |
| Prostaglandina $D_2$ | Mastocite<br>Bazofile<br>Macrofage etc. | Contracţia muşchilor netezi<br>Vasodilataţie<br>Edem al mucoaselor |
| Leucotriene (LTA, Mastocite $LTB_4$, LTC, $LTD_4$ etc.) | Mastocite<br>Bazofile<br>Neutrofile | Provoacă dilatarea capilarelor<br>Măresc permeabilizarea vaselor |

*Bradikinina (*bradi* = lent; *kini* = acţiune)

Iniţial nu a fost acceptată ideea că astmul bronşic este consecinţa unui proces inflamator. În prezent se acceptă existenţa unui astfel de proces în care granulocitele eozinofile şi probabil şi cele PMN au un rol important în declaşarea şi mai ales în menţinerea bolii. În afară de rolul anticorpilor IgE, nu este exclus ca, datorită unor dereglări în cooperarea *Th*-granulocite pe de o parte şi în mecanismele de autocontrol al funcţiilor toxice ale granulocitelor pe de altă parte, acestea din urmă, atunci când sunt stimulate de prezenţa la nivelul mucoasei bronşice a unor germeni patogeni sau nepatogeni, să elibereze, în afara oricărui control, cantităţi mari de radicali toxici de oxigen.

Dereglarea în sinteza unor enzime cu rol reglator al eliberării acestor radicali (SOD, catalază etc.) la nivelul eozinofilelor sau PMN face imposibilă blocarea proceselor oxidative aşa că, pe măsură ce se eliberează cantităţi crescute de $O^{-}_2$, $H_2O_2$, $^1O_2$ etc., se vor amplifica şi leziunile tisulare datorită arderilor excesive. Detritusurile celulare vor elibera factori chemotactici care vor "chema" tot mai multe

granulocite, instalându-se în acest fel un cerc vicios nociv, care nu poate fi oprit prin medicaţii supresoare ci doar printr-o terapie specifică (autovaccin obţinut din flora traheo-bronşică a pacientului) asociată cu una imunomodulatoare (Cantastim) care să readucă în limite normale funcţiile de control ale celulelor *Th*. Rezultatele clinice obţinute prin această conduită terapeutică sunt încurajatoare, confirmând ipoteza.

Este cunoscut faptul că la atopici nivelul IgE seric este crescut, iar numărul receptorilor pentru această clasă de imunoglobuline pe mastocite, eozinofile etc. este de 5 - 10 ori mai mare decât la normali. Sinteza IgE este controlată de către limfocitele $Th_2$ supuse acţiunii IL-4, citokinele eliberate de $Th_2$ (IL-4, IL-5, IL-10) activând la rândul lor multiplicarea progenitorilor eozinofilici şi mastocitari şi, deci, eliberarea mediatorilor solubili cu rol în acest tip de hipersensibilitate. Într-adevăr, în lavajul bronşic al astmaticilor este prezentă o cantitate mare de IL-5 care ar explica lanţul recţional limfocit *Th*2 ⟶ citokine ⟶ activare granulocitară (vezi fig. 50). Dar nu este exclus ca acest lanţ să aibă loc, în astmul bronşic infecţios, în primele faze ale bolii, după care s-ar instala procesele de autoagresiune generate de radicalii de oxigen.

Hipersensibilitatea imediată de tip reaginic, pe lângă dezavantajele mari pe care le prezintă, uneori este şi utilă. Ea are un rol important în protecţia organismului faţă de unele infecţii parazitare, blocând penetrarea sau existenţa paraziţilor la nivelul mucoasei intestinale. Moleculele de IgE cu funcţie de anticorpi faţă de unii determinanţi antigenici parazitari se fixează prin fragmentul lor *Fc* la receptorii $Fc\varepsilon$ de pe mastocite, bazofile etc. La un nou contact cu parazitul, vor stimula eliberarea de mediatori care vor atrage granulocitele neutrofile, eozinofile etc. ce vor interveni în apărarea locală şi vor acţiona asupra vaselor şi muşchilor netezi. Contractarea acestora, vasodilataţia şi umectarea excesivă a mucoaselor prin stimularea secreţiei de mucus accelerează eliminarea parazitului. Ca şi în cazul răspunsului imun normal, şi în acest gen de hipersensibilitate ar exista unele mecanisme "reglatorii". Este cazul activării sintezei de către celule a unei "substanţe de reacţie lentă" (SRS = "slow reacting substances") care, după câteva ore de la declanşarea fenomenului reacţional, îl face să diminue, rămânând doar acumularea, la locul reacţional, de celule inflamatorii (macrofage, bazofile, granulocite PMN) atrase de către factorii chemotactici eliberaţi în primele momente.

Acest tip de hipersensibilitate poate fi detectat prin reacţia *Prausnitz-Künster* la om, sau prin *testul de anafilaxie cutanată pasivă* (PCA) la animale, un test pentru punerea în evidenţă a anticorpilor IgE specifici pentru un anumit antigen. Animalele sunt inoculate subcutanat cu serul în care se presupune existenţa IgE reaginic şi apoi, cu alergenul bănuit a fi incriminat. Dacă în ser sunt molecule de IgE cu funcţie de anticorp pentru acest alergen, se vor forma complexe antigen-anticorp care vor declanşa degranularea mastocitelor aflate local şi fenomene alergice. Mai nou, este utilizat testul "radioalergosorbent".

Prin inoculări repetate pe cale subcutanată a unor doze mici de alergen, se realizează desensibilizarea organismului şi evitarea reacţiilor alergice care, de multe ori, au sfârşit letal.

### HIPERSENSIBILITATEA DE TIP II, MEDIATĂ PRIN ANTICORPI (CITOTOXIC - CITOLITICĂ)

Rolul major îl au moleculele IgM sau IgG cu funcţie de anticorp faţă de unele antigene exprimate pe suprafaţa celulelor propriului organism. Distrugerea acestora şi generarea leziunilor poate fi realizată prin trei mecanisme diferite, şi anume: *a)* prin activarea sistemului complement; *b)* prin opsonizare şi *c)* prin citotoxicitate mediată celular anticorp dependentă (fig. 209).

Anticorpii care s-au fixat specific pe suprafaţa celulei activează componentele complementului şi formarea complexului de atac C5b6789 care va perfora membrana plasmatică provocând citoliza. Datorită formării complexelor antigen-anticorp, este activată şi favorizată funcţia fagocitară a macrofagelor şi granulocitelor, atât prin anticorpi, cât şi prin ataşarea componentelor *C* 3b şi *C* 3d la membrană, care vor fi recunoscute de către receptorii pentru *Fc* sau pentru complement de pe membrana celulelor fagocitare care însă, o dată cu vârsta, pierd receptorii pentru *C* 3d. De asemenea, diverse componente ale complementului acţionează chemotactic asupra granulocitelor sau macrofagelor atrăgându-le la locul inflamaţiei activându-le aderenţa, eliberarea radicalilor de oxigen etc., fenomene care amplifică procesele lezionale.

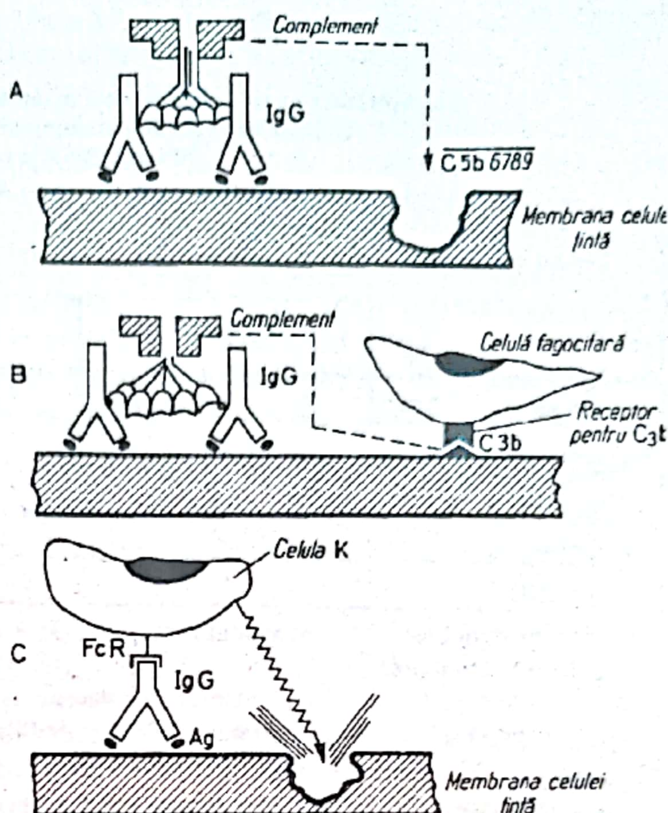



Fig.209. Modalităţi diferite de provocare a leziunilor tisulare în hipersensibilitatea de tip II (citotoxic-citolitică).
A. Prin activarea complexului de atac a complementului (C5b6b789).
B. Prin stimularea fagocitozei imune.
C. Prin citotoxicitate mediată celular, anticorp-dependentă (după I. Roitt şi col.).

A treia posibilitate de lezare a celulelor este activarea funcţiilor citotoxice ale efectoarelor ADCC care, prin receptorul pentru *Fc*, se ataşează la fragmentul *Fc* al moleculelor de anticorp fixate pe celula ţintă. Ataşarea declanşează eliberarea de către celula efectoare a semnalelor citolitice care vor ucide ţinta. Celulele efectoare ale citotoxicităţii mediate celular anticorp-dependentă au o capacitate diferită de liză a celulelor ţintă, condiţionată în special de provenienţa acestora (tabelul 118).

Dintre reacţiile de hipersensibilitate de tip II, mai importante sunt hemoliza postransfuzională, reacţiile la medicamente, anemia hemolitică autoimună, trombocitopeniile, sterilitatea prin anticorpi antispermatozoizi şi "boala hemolitică a nou-născutului" provocată de către incompatibilitatea *Rh*. În cazul hemolizei postransfuzionale, subiecţii care primesc hematiile străine au anticorpi naturali faţă de acestea, care, fixându-se pe ele, vor provoca liza dependentă de complement. Specifică omului este incompatibilitatea *Rh* responsabilă de boala hemolitică a nou-născutului. Unii bărbaţi sunt *Rh* $D^+$, adică au exprimat pe suprafaţa celulelor lor antigenul D existent la maimuţele *Rhesus*, iar alţii, sunt lipsiţi de acest antigen, fiind *Rh* $D^-$. Dacă o femeie *Rh* $D^-$ este fecundată de către un bărbat *Rh* $D^+$, în serul ei vor apărea anticorpi anti-D care vor provoca hemoliză şi grave tulburări produsului de concepţie *Rh* $D^+$, fenomene care pot avea sfârşit letal.

*Tabelul 118*

**Susceptibilitatea unor celule ţintă la citotoxicitatea mediată celular, realizată de către diferite tipuri de celule efectoare (după I. Roitt şi col.)**

| Celula efectoare | Originea celulelor ţintă | | |
|---|---|---|---|
| | Animală | Bacteriană | Vegetală |
| K (efectoare a ADCC) | +++ | ± | ? |
| Fagocite mononucleare | ++ | +++ | ? |
| Neutrofile | ± | ++++ | ? |
| Trombocite | ± | ? | ? |
| Eozinofile | ? | ? | ++ |

?= nu se cunoaşte; ± = susceptibilitate redusă; ++= susceptibile; +++ sau ++++= susceptibilitate foarte mare.

În această situaţie, se pot administra profilactic anticorpi anti-*Rh* D care vor liza celulele *Rh* $D^+$ evitând astfel sensibilizarea mamei.

Anemia hemolitică autoimună este o stare patologică generată de apariţia unor autoanticorpi anti-hematii proprii. Aceşti autoanticorpi aparţin la două tipuri funcţionale diferite fiind: *a)* "aglutinine calde" care reacţionează cu hematiile proprii, lizându-le numai la temperatura fiziologică de 37°C şi *b)* "aglutinine reci" care reacţionează numai la temperaturi sub-normale (36°C). *In vivo,* aceste aglutinine se fixează pe eritrocitele din circulaţia periferică unde este cea mai scăzută temperatură corporală.

Tot acestui tip de hipersensibilitate îi aparţine şi "sindromul GOODPASTURES" a cărui caracteristică majoră din punct de vedere clinic este disfuncţia respiratorie şi urinară consecutiv lezionării membranei bazale a pulmonului şi rinichiului de către autoanticorpi care recunosc unele antigene exprimate pe suprafaţa celulelor acestor organe.

## HIPERSENSIBILITATEA DE TIP III, MEDIATĂ PRIN COMPLEXE IMUNE

Antigenele ajunse în circulaţie formează cu anticorpii complexe imune care sunt eliminate fie prin fagocitoză opsonică, fie prin filtrare la nivelul rinichilor. Eliminarea antigenelor sub formă de complexe antigen-anticorp este o modalitate eficientă de epurare a structurilor străine de organism. În unele cazuri, însă, complexele se fixează pe diverse ţesuturi şi la nivelul endoteliilor vaselor sangvine. Prezenţa lor activează, prin receptorii pentru *Fc*, trombocitele şi bazofilele care vor elibera amine vasoactive ce vor provoca creşterea permeabilităţii vasculare şi intensificarea depunerii în continuare a complexelor. Totodată, sunt activate componentele complementului şi sinteza factorilor chemotactici pentru granulocitele PMN care vor agrava leziunile instalate.

Leziunile devin evidente clinic în decurs de 3 - 6 ore de la contactul cu antigenul, de unde şi denumirea de "târzie" sau "intermediară" care se dă acestui tip de hipersensibilitate, dat fiind că durata de timp necesară exprimării clinice a

fenomenului este intermediară hipersensibilităţilor de tip "imediat" şi "întârziat". Acest tip de hipersensibilitate este rezultatul unor infecţii persistente, cum este cazul malariei sau al inhalării masive a unor alergene care provoacă aglomerarea locală de anticorpi. Această înaltă încărcare cu antigene este asociată cu un răspuns ineficient în anticorpi. Spre deosebire de hipersensibilitatea de tip I unde molecula de anticorp este IgE, în cea de tip III anticorpii aparţin claselor IgM şi IgG necitofilici, deci care nu se fixează obligatoriu pe receptorii pentru *Fc* de pe celulă. Ei sunt circulanţi, precipită antigenul şi declanşează procese de coagulare, de extravazare leucocitară şi apariţia edemelor. Eliminarea lor din circulaţie este condiţionată de dimensiunile lor, de valenţele antigenului, de clasa şi afinitatea anticorpilor care intră în componenţa complexelor precum şi de cantitatea complexelor aflate în circulaţie. Probabil că de aceea "boala complexelor" are loc în infecţii şi în bolile autoimune unde sunt cantităţi mari de antigen.

Pe baza organelor sau a ţesuturilor interesate, a naturii antigenelor şi a cauzelor care au dus la apariţia lor în oganism, bolile provocate de către complexele imune ar putea fi încadrate în trei grupe distincte (tabelul 119).

*Tabelul 119*

**Grupe de boli generate de către complexele imune, în funcţie de cauza favorizantă a contactului cu antigenele, de originea acestora şi de locul de depozitare a complexelor antigen-anticorp**

| Grupa de boli | Cauza | Originea antigenului | Locul de depozitare a complexelor imune |
|---|---|---|---|
| I | Infecţii persistente | Bacteriană | Organe infectate<br>Rinichi |
| II | Autoimunitate | Proprii | Rinichi<br>Piele<br>Articulaţii<br>Artere |
| III | Antigene exogene | Din mediul ambiant | Pulmon |

Raportul dintre moleculele de antigen circulant şi cele de anticorp determină fie circulaţia complexelor, fie reţinerea lor la nivelul ţesuturilor sau organelor. În exces de antigen, complexele sunt solubile şi circulante. Iniţial, ele sunt în număr mic, nu se fixează, nu sunt fagocitate şi sunt eliminate prin glomerulul renal.

Pe măsură ce titrul anticorpilor creşte, complexele devin tot mai numeroase. În momentul în care se ajunge la un echilibru relativ între antigen şi anticorp, cu menţinerea unui exces moderat de antigen, complexele încep să se depună pe pereţii vaselor sangvine, cu predilecţie acolo unde circulaţia sangvină este stânjenită. Odată fixate, ele activează sistemul complement şi eliberarea de histamină din bazofile şi mastocite, iar acţiunea chemotactică a *C3a* şi *C5a* atrage neutrofilele care vor elibera enzimele lizozomale. Acestea, asociate aminelor vasoactive eliberate de către bazofile şi mastocite, vor amplifica leziunea locală şi vor mări permeabilitatea vaselor. Încep să fie antrenate şi trombocitele care aglutinează, formând trombuşi ce vor ocluziona capilarele, le vor mări permeabilitatea şi vor contribui la agravarea necrozei tisulare.

Locurile de elecţie pentru depozitarea complexelor sunt rinichii, articulaţiile şi joncţiunea dintre derm şi epiderm de la nivelul pielii. În situaţia în care anticorpii precipitanţi sunt în exces, complexele se formează rapid, chiar la locul de inoculare a antigenului. În decurs de 3-6 ore, se dezvoltă o intensă reacţie inflamatorie locală cu infiltrare celulară şi activarea componentelor complementului.

Un exemplu tipic de hipersensibilitate de tip III este "boala serului", care apare în caz de exces de antigen, ca o complicaţie a seroterapiei. Inocularea unor doze mari de ser imun favorizează formarea de complexe consecutiv legării antigenului liber şi depunerea lor la nivelul membranei bazale a glomerulului renal şi pe pereţii vaselor, creşterea permeabilităţii vasculare şi, în final, activarea proceselor inflamatorii, care clinic se manifestă ca nefrite sau artrite.

"Fenomenul Arthus" este o reacţie de hipersensibilitate locală, care se dezvoltă în exces de anticorpi, din care cauză procesul reacţional este situat la locul de pătrundere a antigenului. Persoanele hiperimunizate, deci cu un exces de anticorpi IgG, dezvoltă, atunci când sunt inoculate pe cale subcutanată sau intradermic cu acelaşi antigen, o reacţie locală caracterizată prin apariţia de edeme şi de leziuni hemoragice. Acestea sunt consecinţa formării rapide de complexe antigen-anticorp, a depunerii lor pe pereţii vaselor şi declanşării infiltraţiilor cu neutrofile, bazofile, agregarea trombocitelor, activarea sistemului complement etc.

Depunerea complexelor imune şi generarea acestor reacţii de hipersensibilitate este condiţionată printre altele de mărimea complexelor şi de clasa de imunoglobuline care intră în combinaţie cu antigenul. Complexele mici nu se depun în ţesuturi, find eliminate pe la nivelul rinichiului. Cele formate cu anticorpi IgG sunt mai persistente în comparaţie cu cele formate cu anticorpi IgM.

Clinic, alterările date de acest tip de hipersensibilitate se manifestă sub formă de artrite reumatoide, poliartrite, polimiozite, vasculite cutanate, observabile frecvent în lupusul eritematos sistemic, malarie, tripanosomiaze, endocardite bacteriene etc.

La animale, forma cea mai cunoscută de hipersensibilitate de tip III este "boala nurcii aleutine" declanşată de o infecţie virală cronică, la care este susceptibilă nurca homozigotă pentru gena "aleutină" (blană de culoare deschisă). Animalele prezintă anticorpi antinucleari care produc leziuni similare lupusului eritematos sistemic al omului, poliartrită nodoasă, hepatită, vasculită, glomerulonefrită cu insuficienţă renală etc. În patologia umană, reacţii de hipersensibilitate de acest gen se mai întâlnesc în sindroame de genul bolii "plămânului de fermier" sau al "plămânului iubitorilor de păsări", situaţie în care alergenul este de natură fungică, cu referire specială la sporii de *Mycropolyspora faeni,* o actinomicetă termofilă, sau polen, puf etc.

### HIPERSENSIBILITATEA DE TIP IV

Hipersensibilitatea de tip întârziat,"tuberculinic", sau de tip IV se deosebeşte de celelalte tipuri prin următoarele:

*a.* Fenomenele reacţionale sunt manifestate clinic tardiv, după 24 - 48 de ore sau chiar după 10 - 20 de zile de la contactul cu antigenul.

*b.* Nu poate fi transmisă prin ser ci prin limfocitele *T* de "hipersensibilitate de tip întârziat" (*T*d).

*c.* Leziunile sunt situate exclusiv local, la locul de inoculare a antigenului.

Limfocitele *Td*, sensibilizate de către un antigen, la un nou contact cu acesta eliberează limfokine care vor recruta la locul de reacţie alte tipuri de celule şi în special macrofage, a căror intervenţie va provoca leziuni ce vor deveni vizibile după 24 - 48 de ore. La locul reacţiei sunt infiltraţii de limfocite *Td*, de macrofage etc., care secretă tot mai multe limfokine şi alte enzime capabile să distrugă celulele ţesutului lezat şi să amplifice inflamaţia. Modificările locale constau din alterarea iniţială a permeabilităţii vasculare, dilatarea vaselor, urmate de infiltrarea zonei respective cu celule mononucleare. În cazul în care evenimentele au loc la nivelul pielii, aceasta se indurează şi se congestionează.

De fapt, evoluţia reacţiei de apărare spre răspuns imun normal sau spre hipersensibilitate de tip întârziat este condiţionată de către o serie de factori favorizanţi (tabelul 120).

*Tabelul 120*

**Factori dependenţi şi independenţi de antigen care influenţează orientarea reacţiilor imune spre sinteza de anticorpi sau spre sensibilitate de tip întârziat (după C.R.Parish)**

| Cazuri în care stimulul induce sinteza de anticorpi | Cazuri în care stimulul induce hipersensibilitate de tip întârziat |
|---|---|
| Antigene cu conformaţie stabilă | Antigene nestabile conformaţional |
| Determinanţi antigenici repetitivi | Determinanţi antigenici reduşi numeric |
| Complexe antigen-anticorp în exces de antigen | Complexe antigen-anticorp în exces de anticorp |
| Doze moderate de antigen | Doze foarte mari sau foarte mici de antigen |
| Absenţa substanţelor imunodepresoare (ciclofosfamida) | Asocierea stimulului antigenic cu substanţe imunodepresoare |

Există mai multe tipuri de hipersensibilitate de tip întârziat (tabelul 121) cu diferenţe mai mult sau mai puţin semnificative între ele. De exemplu, în cazul

*Tabelul 121*

**Tipurile de hipersensibilitate întârziată şi caracteristicile lor principale**

| Tipul reacţiei | Jones-Mote | Contact | Tuberculinic | Granulomatos |
|---|---|---|---|---|
| Timpul de apariţie | 24 ore | 24 - 48 ore | 24 - 48 ore | 4 săptămâni |
| Aspectul clinic | - Tumefacţia pielii | - Eczemă | - Induraţie locală, febră | - Induraţia pielii |
| Aspectul histologic | - Infiltraţii cu bazofile, limfocite, mononucleare | - Edem, epidermite<br>- Infiltraţii cu mononucleare | - Infiltraţii cu limfocite şi mononucleare | - Granuloame cu celule epiteloide, celule gigant, macrofage<br>- Fibroză<br>- Necroză |
| Antigenul şi calea de administrare a lui | - Ovalbumină etc.<br>- Intradermică | - Epidermică | - PPD, *Leishmania*<br>- Dermică | - Persistenţa antigenului sau a complexelor antigen-anticorp în macrofage |

hipersensibilităţii de contact sau de tip tuberculinic, leziunile devin evidente în 24-48 de ore, pe când în cazul celei granulomatoase, după 14 - 20 de zile.

**Reacţiile JONES-MOTE** (sau hipersensibilitatea cutanată "bazofilică") apar la 24 de ore după contactul cu alergenul. După cum rezultă şi din denumirea ei, locul de contact cu acesta este infiltrat în special cu bazofile. Sunt reglate de către limfocitele *T* supresoare.

**Hipersensibilitatea de contact** este o reacţie a epidermului caracterizată prin eczeme locale determinate de prezenţa antigenului, eczeme care dispar după eliminarea acestuia. Antigenele responsabile de acest tip de reacţie pot fi molecule mari sau haptene cu greutate moleculară mică ce se cuplează cu proteinele organismului, modificându-le în aşa fel încât sunt recunoscute ca străine. Este cazul dinitroclorbenzenului sau dinitrofluorbenzenului (DNCB, DNFB), al ionilor de Ni (nichel), recunoscute – atunci când sunt cuplate cu proteinele – de către celulele Langerhans care le captează şi le prezintă limfocitelor *T*.

**Hipersensibilitatea de "tip tuberculinic",** descrisă pentru prima dată de către R.KOCH, se instalează după inocularea intradermică, la persoanele bolnave de tuberculoză, a proteinelor derivate din mycobacterii. De asemenea, este întâlnită în infecţiile cu *Maleomyces malei* (morvă) şi cu *Schistosoma mansoni*. După 24 de ore, până la 48 de ore, la locul de inoculare a tuberculinei, PPD, maleinei etc. apar o tumefacţie dură şi microvezicule în epiderm, provocate de către infiltraţiile cu limfocite, monocite şi granulocite PMN. După 72 de ore, reacţia dispare dar, uneori, poate persista timp îndelungat ca hipersensibilitate de "tip granulomatos". Spre deosebire de hipersensibilitatea de contact, unde reacţia are loc la nivelul epidermului, în cea de tip tuberculinic regiunea interesată este cea subcutanată. Acest tip de hipersensibilitate are o deosebită importanţă practică, fiind folosită pentru depistarea persoanelor bolnave de tuberculoză (prin testul de "intradermoreacţie" sau testul Mantoux), morvă sau în unele infecţii parazitare, care dau "reacţii pozitive", bineînţeles cu excepţia celor care prezintă "toleranţă imunologică" sau imunodepresii grave.

**Hipersensibilitatea granulomatoasă** este consecinţa persistenţei agentului patologic în interiorul macrofagelor, ca urmare a imposibilităţii acestor celule de a-l distruge. Rezultatul este formarea de granuloame cu celule epiteloide. Agenţii cauzali sunt substanţe imunogene de origine bacteriană sau de alte provenienţe ca şi substanţe neimunogene. În granulom, macrofagele fagocitează sau înconjoară agentul inductor, la rândul lor fiind înconjurate de către limfocite. La periferia formaţiei granulomatoase sunt fibroblaste şi colagen. Din fuzionarea macrofagelor cu fibroblastele rezultă celule gigant, mari, cu mai mulţi nuclei, cu vezicule citoplasmatice, cu reticulul endoplasmatic sărac, cu mitocondriile şi lizozomii degeneraţi. În reacţiile de tip întârziat, rolul limfokinelor ca mesageri intercelulari este uriaş. De aceea, orice formă de stres, care duce la alterări profunde ale răspunsului imun normal, poate duce şi la inhibiţia sintezei limfokinelor şi monokinelor, urmată de anularea acestui tip de reacţie, cu rol revelator major în unele boli contagioase.

După unii ar mai exista şi "tipul V" de hipersensibilitate, denumit şi "tipul stimulator" în care intervin autoanticorpi care stimulează funcţional unele ţesuturi proprii, ca de pildă stimularea tiroidei de către autoanticorpi care mimează hormonii tiroidieni legându-se la receptorii pentru aceştia.

# AUTOIMUNITATEA

Sistemul imun are rolul de a conserva integritatea organismului împiedicând pătrunderea sau persistenţa în intimitatea ţesuturilor sale a tot ce este străin de el, sau apariţia şi proliferarea celulelor deviate neoplazic care, datorită mutaţiilor survenite devin nocive pentru celulele normale. El funcţionează pe baza unor reguli care impun următoarea conduită: lezarea maximă a structurilor non-proprii şi minimă a celor proprii. Abaterea de la aceste reguli duce la orientarea inversă a activităţii sale, adică la lezarea maximă a propriilor ţesuturi, la autoimunitate.

Distincţia dintre propriu şi străin fundamentează întregul eşafodaj de apărare imună, în sensul că efectoarele acestui sistem reacţionează discriminatoriu numai faţă de componentele străine şi le acceptă pe cele proprii. Această aceptare ar fi expresia unei inactivări totale a clonei de limfocite ("toleranţă centrală") sau doar a inhibării funcţionale a ei ("toleranţă specifică"). Deci, abilitatea de a recunoaşte şi a reacţiona faţă de structurile străine este strâns împletită cu cea de recunoaştere dar şi de acceptare a celor proprii.

Aşa s-ar întâmpla în "condiţii normale". Dar, din cauze multiple, dintre care unele încă insuficient elucidate sau probabil chiar total ignorate în prezent, "condiţia normală" se modifică, fapt care facilitează dezvoltarea de reacţii imune specifice faţă de unii determinanţi antigenici proprii. În urma acestui fapt, sunt generate procese de autoagresiune sau de autoimunitate, care "ţintesc" fie determinanţi antigenici ai unui singur organ, declanşând "autoimunitatea cu specificitate de organ", fie determinanţii antigenici existenţi la nivelul mai multor organe declanşând "autoimunitatea sistemică". În cel de al doilea caz, apar autoanticorpi care au specificitate pentru antigenele proprii larg răspândite în organism, cum ar fi de pildă în lupusul eritematos sistemic (tabelul 122).

Desigur, această clasificare este relativă deoarece există boli autoimune care ocupă "poziţii intermediare" în sensul că, deşi nu pot fi riguros încadrate în grupa celor sistemice" sau a celor "cu specificitate de organ", se apropie de una sau alta dintre aceste situaţii.

Dintre bolile autoimune sistemice, bine cunoscut este "lupusul eritematos sistemic", o vasculită care afectează diverse organe cu lezarea celulelor sistemului hepatopoietic, a pielii, rinichilor etc. Sunt prezenţi anticorpi anti-eritrocitari, anti-trombocitari, anti-acizi nucleici etc., care fixându-se pe celulele ţintă provoacă anemie, trombocitopenie şi formarea de complexe imune antigen+anticorp care se depun la nivelul diferitelor ţesuturi. Boala, răspândită la om, îşi are corespondentul ei la şoarecii din tulpina NZW şi la câine, animale la care a fost pusă în evidenţă existenţa de anticorpi anti-nucleari, anti-histone etc. Este o strictă corelaţie între titrul acestor autoanticorpi şi gravitatea bolii.

Din grupa bolilor cu specificitate de organ, trebuie menţionate cele în care autoagresiunea vizează glandele endocrine, cum este cazul tiroiditei autoimune, a paratiroiditelor, pancreatitelor, sau sistemul nervos, tubul digestiv, aparatul genito-urinar, pielea, muşchii, ochii etc.

Agresiunea autoimună poate fi realizată de către anticorpi, de către diferite celule cu funcţii citotoxice ca limfocitele *T*, *NK*, macrofagele, sau de căre anticorpii şi celulele citotoxice.

La sfârşitul secolului trecut, sub dominaţia conceptului de "horror autotoxicus", adică de "groază de autoagresiune" lansat de către P.EHRLICH, era vehiculată ideea că nu pot exista reacţii imune faţă de componentele organismului propriu, reacţiile imune fiind în exclusivitate destinate recunoaşterii şi eliminării agresorilor

**Boli autoimune cu "specificitate de organ", boli "sistemice" şi "situaţii intermediare"**

| Specificitatea | Boala autoimună |
|---|---|
| De organ | - Tiroidita Hashimoto<br>- Mixedemul primar<br>- Tireotoxicoza<br>- Anemia pernicioasă<br>- Gastrita atrofică autoimună<br>- Vitiligo<br>- Boala lui Addison |
| Intermediară | - Miastenia<br>- Diabetul juvenil<br>- Sindromul GOODPASTURE<br>- Pemfigus comun<br>- *Scleroza în plăci (?)*<br>- Anemia hemolitică autoimună<br>- Purpura trombocitopenică idiopatică<br>- Leucopenia idiopatică<br>- Ciroza biliară primitivă<br>- Sindromul Sjögren |
| Sistemice | - Lupusul eritematos sistemic<br>- Dermatomiozitele<br>- Sclerodermia<br>- Poliartrita reumatoidă |

străini. Dar, în anul 1900, I. MECINICOFF reuşeşte să imunizeze cobaii cu proprii lor spermatozoizi, demonstrând că se pot forma anticorpi faţă de structurile organismului propriu şi că aceşti anticorpi sunt nocivi pentru acestei structuri. După patru ani, E. DONATH şi K. LANDSTEINER semnalează existenţa la om a unei boli autoimune apărută spontan: hemoglobinuria paroxistică "a frigore". În deceniile următoare au fost descoperite alte boli de autoagresiune. Trebuie însă menţionat faptul că nu întotdeauna o reacţie de autoagresiune trebuie să fie urmată de apariţia unei boli, de multe ori aceste reacţii fiind lipsite de o simptomatologie zgomotoasă care să poată fi sesizată clinic. Aşadar, autoimunitatea poate fi "nepatogenă" şi "patogenă". Cea "nepatogenă" are efecte benefice, contribuind la eliminarea autoantingenelor eliberate cu ocazia unor distrugeri celulare şi tisulare sau contribuind la reglarea reacţiilor imune, cum este cazul anticorpilor anti-idiotip, al unor subpopulaţii de limfocite *T* etc.

Autoimunitatea patogenă este responsabilă de provocarea unor boli, uneori foarte grave, rezultate ca urmare a unor agresiuni autoreactive (tabelul 123).

*Tabelul 123*

**Boli autoimune mai des întâlnite la om**

| Organele sau ţesuturile | Boala |
|---|---|
| Celulele aflate în circulaţia sangvină | Anemia hemolitică, trombopeniile, leucopeniile autoimune, eritroblastopeniile autoimune |
| Ţesutul conjunctiv | Lupusul eritematos sistemic, sclerodermia, poliartrita reumatoidă, dermatomiozitele, miozitele, sindromul Sjögren |
| Pielea | Psoriazis, dermatita herpetiformă |
| Glande endocrine | Tiroidita Hashimoto, boala Basedow, boala Addison idiopatică, hipoparatiroidita idiopatică, diabetul insulino-dependent, mixedemul primitiv, hipofizita autoimună |
| Sistemul nervos | Scleroza în plăci, polinevritele, encefalitele post-vaccinale (poliomielitică, rabică), panencefalita sclerozantă (?), demielinizările autoimune post-chirurgicale |
| Tubul digestiv | Boala Biermer, boala Crohn, rectocolita hemoragică, hepatite cronice non-virale, pancreatite, ciroze biliare primitive, ciroza idiopatică |
| Rinichi , pulmon | Glomerulonefrita, nefritele interstiţiale, sindromul Goodpasture, fibroze interstiţiale difuze idiopatice |
| Ochi | Oftalmia simpatică, cataracta senilă (?), uveo-retinite (?) |
| Alte organe sau ţesuturi | Cardiopatiile reumatismale, miastenia, sindromul lui Dressler, crioglobulinemiile, vitiligo |

Dintre bolile autoimune sistemice, fără specificitate de organ, este bine cunoscut "lupusul eritematos sistemic" (LES), o vasculită care lezează celulele sistemului hematopoietic, lezare însoţită de afectarea unor organe ca pielea, rinichii etc. La pacienţii cu LES sunt prezenţi în concentraţii crescute autoanticorpi anti-acizii nucleici, anti-eritrocitari, trombocitari etc. Aceştia, pe lângă anemia şi trombocitopia pe care o realizează, formează şi complexe antigen-anticorp care se depun la nivelul diferitelor ţesuturi şi organe. Boala este răspândită la om, având corespondent şi la câine şi unele tulpini de şoarece (NZW.) Între titrul autoanticorpilor şi severitatea bolii este o corelaţie semnificativă.

Spondilitele ankilozante, artritele reumatoide, sclerodermiile, bolile de colagen etc. sunt boli autoimune fără specificitate de organ.

Dintre cele cu specificitate de organ, bine cunoscute sunt tiroidita autoimună, paratiroiditele, pancreatitele, boli ale pielii, muşchilor, tubului digestiv etc.

Reacţiile autoimune pot fi realizate şi experimental, prin inocularea de diferite antigene, de regulă asociate cu adjuvantul Freund complet, care induc fie sinteza de anticorpi, fie proliferarea de clone autoreactive de limfocite *T* şi declanşarea unor boli de autoagresiune dintre care multe au corespondent cu unele boli

autoimune umane (tabelul 124). De fapt, cunoştinţele noastre referitoare la unele procese autoimune generate de limfocitele *T* au fost obţinute prin modelul encefalitei alergice experimentale (EAE), o demielinizare inflamatorie similară sclerozei multiple umane. EAE poate fi indusă prin imunizarea animalelor cu "proteina mielinică de bază" (MBP) sau cu proteolipide (PLP). Aşa s-a dovedit că în cursul instalării autoimunităţii există o reacţie dinamică în cursul căreia sunt antrenate secvenţial diferite populaţii de limfocite *T*. La şoarece, de pildă, imediat după inocularea MBP se declanşează răspuns imun faţă de secvenţa peptidei 1-11, după care sunt antrenate şi clonele de celule care recunosc determinanţii 35 - 47, 81 - 100, 121-140, chiar dacă imunizarea a fost făcută numai cu secvenţa 1 - 11. Ar fi o "recrutare" a unui repertoriu reacţional generat de către un stimul unic, care va duce la progresia bolii prin recrutarea de limfocite *T* cu alte specificităţi de recunoaştere.

*Tabelul 124*

**Boli autoimune care pot fi induse experimental**

| Boala | Agentul imunizant | Corespondentul la om |
|---|---|---|
| Orhita | Spermatozoizii autologi | Sterilitatea masculină |
| Tiroidita | Tireoglobulina<br>Celule tiroidiene | Tiroidita Hashimoto |
| Inflamaţii ale corticosuprarenalei | Celule corticale | Boala Addison |
| Poliradiculonevrită | Mielina din SNP | Sindromul Guillain-Barré |
| Encefalomielita alergică | Mielina SNC<br>Peptide encefalitogene | EA acută, după vaccinarea antirabică<br>EA recidivantă (scleroza în plăci) |
| Hepatita cronică | Antigenele de pe suprafaţa hepatocitelor | Hepatita cronică activă autoimună |
| Glomerulonefrita prin autoanticorpi anti-membrana bazală | Intoxicaţii cu mercur<br>Antigenele de pe membrana bazală | Sindromul Goodpasture<br>Glomerulonefrita autoimună |
| Anemia hemolitică murină | Hematii de şobolan<br>Hematii de şoarece modificate prin încălzire | Anemia hemolitică autoimună |
| Uveoretinite | Glicoproteina IRBP<br>Rodopsina (un pigment) | Uveoretinite |
| Poliartrite | Adjuvant Freund complet<br>Proteoglicani<br>Colagen II | Poliartrită reumatoidă |

EA=encefalomielita alergică; IRBP=Interphotoreceptor Retinoidbinding Protein, o proteină de 140 kD care leagă retinoizii fotoreceptorilor; SNC= sistemul nervos central; SNP= sistemul nervos periferic.

Realizarea experimentală a proceselor autoimune nu este obligatoriu asociată cu manifestarea clinică a bolii. Acest fapt demonstrează că şi la oameni pot exista procese de autoagresiune care nu sunt exprimate clinic şi, deci, că nu există o toleranţă absolută a sistemului imun faţă de antigenele proprii organismului. Ca atare, se poate afirma că toleranţa imunologică explicată prin existenţa unei "deleţii clonale", a absenţei totale a clonelor de celule care pot recunoaşte structurile organismului propriu, nu este absolută. De altfel, este tot mai acceptată ideea că limfocitele "autoreactive" sunt o componentă a repertoriului sistemului imun, dar numai o mică parte dintre ele pot deveni celule efectoare ale proceselor patologice. În cazul unor antigene, toleranţa poate fi dată de lipsa clonei de limfocite, pe când în cazul altora, lipsa răspunsului imun ar fi expresia unei supresii active sau consecinţa "sechestrării" unor antigene.

Autoantigenele ar putea fi încadrate, din punct de vedere al accesibilităţii lor faţă de acţiunea sistemului imun, în două categorii distincte: *a)* autoantigene "sechestrate", deci inaccesibile şi *b)* autoantigene "protejate" de bariere anatomice sau chimice care sunt oarecum accesibile efectorilor imunităţii. Din primul grup pot fi amintiţi spermatozoizii, iar din cel de al doilea grup, mielina, antigenele ochiului, unele antigene intracelulare etc.

Răspunsul imun faţă de antigenele proprii, nesechestrate, este condiţionat printre altele şi de nivelul lor în circulaţie: atunci când sunt în cantităţi mari, cum este cazul albuminei serice, areactivitatea faţă de ele este totală, supresia acţionând atât asupra celulelor *B* cât şi asupra celor *T;* dacă, însă, concentraţia autoantigenelor este redusă, ca de pildă în cazul tireoglobulinei, atunci toleranţa este parţială şi se manifestă la nivelul limfocitelor *T.* Creşterea nivelului seric, în acest caz, generează sinteza de autoanticorpi.

Pot declanşa sinteza de anticorpi antigenele proprii modificate, cum este cazul cuplării proteinelor organismului cu unele haptene străine, sau asocierea lor la adjuvantul Freund complet. De exemplu, cuplarea arsenului la tireoglobulină o poate face imunogenă pentru propriul organism.

Pot apărea anticorpi şi după stimulări cu antigene care au epitopi comuni cu unii determinanţi antigenici existenţi la nivelul celulelor proprii. De exemplu, stimulul antigenic cu streptococi patogeni poate declanşa endocardita autoimună datorită înrudirii antigenice existente între celulele endocardului şi streptococii beta-hemolitici.

Şi imunizarea cu antigene heterologe poate avea efecte similare. Este cazul inoculărilor cu tireoglobulină heterologă urmată de formarea de anticorpi antitireoglobulină proprie şi, implicit, de tiroidită autoimună.

Mecanismele care stau la baza declanşării reacţiilor autoagresive nu sunt perfect cunoscute. În linii generale, ar fi vorba de un gen de "scurt circuit" funcţional al limfocitelor *T* care ar fi derepresate, devenind autoreactive. Această situaţie poate avea loc atunci când se fac imunizări cu antigene cu determinanţi comuni celor ai ţesuturilor proprii etc. Au fost emise diferite ipoteze care încearcă explicarea lor, dar nici una dintre ele nu aduce dovezi experimentale pentru a fi acceptată fără rezerve.

Cele mai cunoscute ipoteze sunt următoarele:

*a. Teoria antigenului sechestrat,* conform căreia unele antigene, cum ar fi cele ale sistemului nervos, ale cristalinului, tiroidei, spermatozoizilor etc., sunt "sechestrate" de către bariere anatomice şi, ca atare, nu au fost "inventariate" de către celulele sistemului imun în cursul dezvoltării embrionare a organismului, din care cauză acesta nu le recunoaşte ca fiind ale lui. Ele rămân izolate şi inaccesibile recunoaşterii imune, până când bariera anatomică este înlăturată accidental, ca

de pildă în cazul unor intervenţii chirurgicale pe creier când, prin secţionarea unor filete nervoase, mielina care era "sechestrată" ajunge în exteriorul nervului şi pătrunde în circulaţie. În această situaţie, limfocitele "descoperă" prezenţa lor şi le tratează ca pe nişte molecule "străine", dezvoltând reacţii imune. Această ipoteză încearcă să explice şi menţinerea grefei fetale în timpul sarcinii deşi, după cum se ştie, fetusul nu este total izolat de sistemul imun al organismului matern, în acest proces de acceptare a antigenelor străine intervenind un complex de factori.

*b. Teoria clonei interzise* susţine că, prin mutaţii somatice, ar apărea clone de celule limfoide cu receptori pentru unele antigene proprii organismului, clone care în mod normal sunt distruse în cursul maturării lor în organele limfoide primare prin "selecţii pozitive şi negative". Dacă aceste clone nu sunt eliminate la timp, atunci vor reacţiona faţă de antigenele organismului, generând reacţii de auto-agresiune faţă de propriile ţesuturi sau organe.

*c. Teoria deficitului imun* afirmă că în etiologia agresiunii autoimune ar interveni deficite imune care inhibă funcţiile limfocitelor *T* supresoare şi ale altor celule cu rol imunoreglator. În acest fel, unele clone de celule efectoare "scapă" de sub control şi devin reactive faţă de structurile propriului organism. Conform acestei teorii, alterarea circuitelor reglatoare şi inhibarea funcţională sau scăderea numărului de celule *T* supresoare ar fi cauza bolilor autoimune.

Probabil că toate acestea sunt valabile pentru una sau alta dintre bolile autoimune declanşate accidental sau experimental.

În orice caz, limfocitele pot deveni autoreactive în condiţiile în care:

*a)* scapă de selecţia negativă şi pozitivă din timus (deleţie clonală);

*b)* nu primesc semnale supresoare de la citokine;

*c)* nu primesc semnale inductoare de anergie;

*d)* nu sunt blocate de celule supresoare;

*e)* exprimă activ molecule de adeziune.

Este cert că un rol important în declanşarea, întreţinerea şi cronicizarea bolilor autoimunte revine limfocitelor *T*. În sprijinul acestei informaţii stă existenţa – la pacienţii cu astfel de boli – de limfocite autoreactive, al căror transfer la subiecţii normali poate duce la apariţia reacţiilor de autoagresiune. Experimental se poate transfera prin limfocitele *T* autoreactive encefalomielita alergică de la un animal sensibilizat la altul sănătos.

Cu ajutorul tehnicii "reacţiei polimerazice" (PCR = polymerase chain reaction), a fost analizată structura receptorilor pentru antigen de la nivelul limfocitelor *T* infiltrate în procesele inflamatorii locale. Aşa s-a constatat că aceste celule sunt activate într-o manieră antigen-specifică, exprimând gene *V* selective care diferă de cele exprimate în mod normal de către celulele aflate în circulaţie sau în organele nelezionate. Deci, este o dovadă a existenţei unei proliferări clonale cu potenţial de recunoaştere specific pentru unele antigene, respectiv pentru antigenele proprii ale organismului.

În unele boli, ca de exemplu în sindromul tireotoxic GRAVES, limfocitele exprimă intens receptori pentru IL-2, fapt care ar sugera un posibil rol al acestora în generarea sau reglarea unor procese autoreactive. În altele (lupus eritematos sistemic, artrita reumatoidă, sidromul Sjögren etc.) se înregistrează un nivel scăzut al inductorilor de celule supresoare ($CD45R^{+}$) şi o alterare a sintezei de IL-2 de către aceste celule. Toate acestea dovedesc existenţa unor mecanisme multiple care intervin în acest proces atât de complex.

Dar, indiferent dacă este vorba de activarea potenţialului de recunoaştere a antigenului prin receptorii pentru antingen sau de activarea exprimării receptorilor

pentru IL-2 care să ducă la "trezirea" clonelor de limfocite "interzise", aflate în stare de "letargie funcţională", mecanismul de bază care declanşează în faza iniţială această "trezire" este acelaşi şi, prin manipularea lui, se încearcă în prezent găsirea unor mijloace de influenţare a proceselor autoimune.

Este bine cunoscut faptul că activarea specifică a limfocitelor *T* este rezultatul unui complex de reacţii care constau din prelucrarea peptidelor-antigen de către celulele antigen-prezentatoare şi asocierea lor la moleculele MHC de clasa I sau II. Momentele principale în acest proces sunt:

*a)* liza antigenului fagocitat, cu conservarea intactă a epitopilor;

*b)* legarea peptidei-epitop la moleculele MHC -octomeri sau nanomeri atunci când se leagă la moleculele MHC de clasa I şi mai mari decât nanomeri atunci când se leagă la moleculele de clasa II;

*c)* exprimarea complexelor peptidă-MHC pe suprafaţa celulelor antigen-prezentatoare;

*d)* prezentarea, de către aceste celule a complexelor, receptorilor pentru antigen de pe membrana limfocitelor T.

Asocierea peptidelor proprii la situsul de pe MHC poate declanşa reacţiile autoimune. Supresia acestora poate fi realizată, deocamdată mai mult teoretic, prin blocarea acestui situs de pe MHC prin alte peptide care să competiţioneze cu cele declanşatoare ale răspunsului autoimun, prin neutralizarea moleculelor MHC cu anticorpi care vor bloca sitsusurile de legare ale peptidelor, prin blocarea moleculelor *CD*4 din componenţa receptorilor pentru antigen de pe limfocitele *T* etc. (fig. 210). Unele rezultate experimentale obţinute până în prezent sunt încurajatoare. De exemplu, s-a reuşit evitarea inducerii encefalomielitei experimentale alergice prin adiminstrarea de cantităţi mari de peptide sintetice, asemănătoare dar diferite de epitopul dominant al proteinei mielinice de bază (MBP) responsabil de declanşarea bolii. Succese similare au fost obţinute prin inocularea de complexe solubile formate din peptidele autoantigene legate la moleculele MHC sau chiar prin realizarea "toleranţei de zonă înaltă", adică prin inocularea masivă de doze mari din antigenul incriminat.

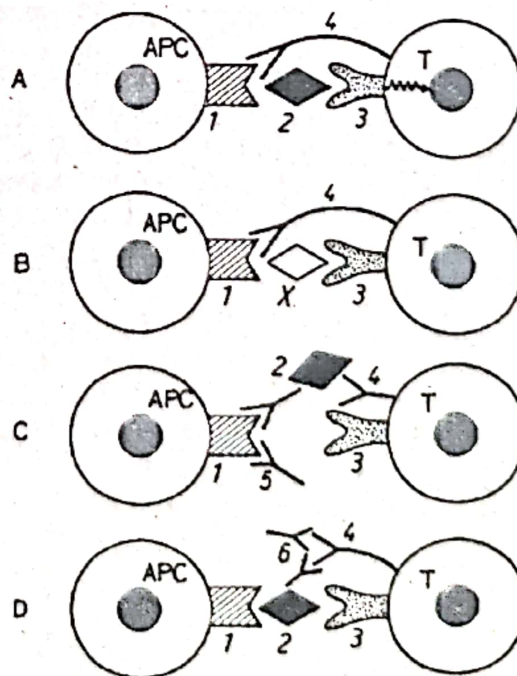



Fig.210. Diferite modalităţi posibile de blocare a reacţiilor autoimune.

A. Celulele prezentatoare de antigen (APC) recunosc peptida antigenică (2) asociată la moleculele MHC proprii (1). Limfocitul T (T) recunoaşte prin receptorul pentru antigen (3) complexul peptidă stimulantă +MHC (1+2), proces în care un rol activ au şi moleculele CD4(4).

B. Substituirea peptidei antigen (2) cu alta (X) blochează posibilitatea de activare a limfocitului T.

C. Anticorpii anti-MHC (5) competiţionează cu peptida antigen (2) pentru situsul de pe MHC şi, în consecinţă, blochează activarea celulei T.

D. Anticorpii anti-CD4 (6) anulează contactul dintre celula APC şi limfocitul T, ajungându-se la imposibilitatea activării policlonale sau monoclonale a celulelor T.

Majoritatea procedeelor de blocare a reacţiilor autoimune se bazează pe conceptul de inactivare funcţională a limfocitelor *T*, inactivare care s-ar realiza prin diferite modalităţi ca: *a)* "deleţia clonală" adică eliminarea ireversibilă a clonei de celule *T* care ar recunoaşte antigenul propriu, prin omorârea ei în cursul maturării intratimice; *b)* prin reducerea potenţialului funcţional al clonei autoreactive, cu menţinerea ei în limitele cele mai reduse sub raportul capacităţii de recunoaştere şi reacţie şi *c)* prin blocarea funcţională a ei cu ajutorul mecanismelor supresoare realizate, în special de către limfocitele *T* supresoare. În cazul deleţiei clonale, este vorba de absenţa totală a limfocitelor *T* autoreactive, iar în celelalte două cazuri de prezenţa "tăcută", nefuncţională a acestor limfocite.

După cum menţionam anterior, posibilităţile de inducere a imunosupresiei în vederea blocării reacţiilor autoimune ar fi, în afară de "deleţia clonală", blocarea situsurilor de legare a peptidelor de la nivelul MHC, blocarea MHC sau a *CD*4 cu anticorpi, inducerea toleranţei de "zonă înaltă" prin inocularea de doze masive de antigen şi activarea mecanismelor supresoare ale organismului.

Agenţii imunosupresori cei mai utilizaţi în prezent se limitează de fapt la cinci medicamente (tabelul 125), fiecare dintre ele având alt mod de acţiune.

*Tabelul 125*

**Agenţii imunosupresori utilizaţi în terapia bolilor autoimune şi principalele "ţinte" asupra cărora acţionează**

| Medicamentul | Ţintele asupra cărora acţionează |
|---|---|
| Steroizii | - Macrofagele, limfocitele *T*, limfocitele *B* |
| Azatioprina | - Limfocitele *T* |
| Ciclofosfamida | - Limfocitele *B* |
| Ciclosporina A (CsA) | - Limfocitele *T* |
| Metotrexat | - Limfocitele *T*, *B* |

Din păcate, toţi aceşti agenţi, în cazul administrărilor prelungite, au unele efecte nedorite sau chiar profund dăunătoare care le limitează utilizarea. De pildă, CsA este nefrotoxică, ciclofosfamida provoacă leucopenie etc. În general, terapia în stadiile iniţiale ale bolii este mai eficace decât în cele tardive. În multe cazuri, după terapie se înregistrează vindecări pentru un timp limitat urmate de reizbucnirea manifestărilor clinice. De regulă, bolile mediate de către autoanticorpi beneficiază de terapia cu ciclofosfamidă, iar cele mediate de către limfocitele *T* autoreactive de terapia cu CsA (tabelul 126).

Plecându-se de la conceptele imunologice în terapie, se încearcă introducerea în arsenalul terapeutic a unor mijloace ştiinţifice raţionale. Este cazul anticorpilor monoclonali anti-*CD*4 de la nivelul receptorului pentru antigen al limfocitelor *T*, al anticorpilor anti-MHC de la nivelul celulelor APC sau al anticorpilor anti-*CD*3, utilizaţi atât pentru realizarea toleranţei la alogrefe, cât şi pentru combaterea unor reacţii autoimune. Se mai folosesc diferite citokine sau anticorpi anti-citokine, ca de pildă anticorpi anti-IL-2 sau anti-receptorii pentru IL-2, conjugate de toxine cu anticorpi anti-*CD*2, -*CD*3, anti-LFA-1 etc. De exemplu, anticorpii anti-*CD*4 ar da rezultate bune în terapia lupusului eritematos sistemic, a artritei reumatoide, encefalitei alergice, diabetului insulino-dependent etc. Recent, se încearcă introducerea în arsenalul terapeutic a ciclosporinei A şi a unor competitori peptidici

*Tabelul 126*

**Sensibilitatea unor boli autoimune mediate de autoanticorpi sau limfocite T la agenţii imunosupresori (după J.F.Bach)**

| Boli mediate de către | Sensibilitate la | |
|---|---|---|
| | Ciclofosfamida | Ciclosporina A |
| *Autoanticorpi* | | |
| Lupusul eritematos sistemic | ++ | + |
| Sindromul Goodpasture | ++ | ± |
| Granulomatoza lui Wegener | ++ | ± |
| Pemfigus | + | ? |
| *Limfocite T* | | |
| Diabetul insulino-dependent | ? | ++ |
| Uveita | ± | ++ |
| Psoriazis* | ? | ++ |

* Se pare că doza optimă de CsA în psoriazis este de 3 mg/kg/zi.

peptidici solubili pentru antigenele MHC care, legându-se la antigenele MHC de clasa I sau II, blochează peptidele imunogene autoreactive întrerupând instalarea lanţului reacţional imun. De asemenea, speranţe mari se pun în anticorpii anti-idiotip prin care s-ar putea neutraliza situsurile combinative de înaltă specificitate de la nivelul regiunilor *V* ale receptorilor pentru antigen.

Este adevărat că unele medicamente, diverse substanţe de origine animală sau vegetală, unele bacterii sau virusuri pot avea determinanţi antigenici comuni sau asemănători cu cei ai organismului şi că reacţiile care vizează neutralizarea acestora pot deveni nocive pentru organism. Dar nu sunt de neglijat nici factorii genetici, multe boli fiind asociate unor gene sau grupe de gene care controlează sinteza unor antigene MHC, cum este cazul unor relaţii dintre antigenele sistemului HLA şi unele boli autoimune la om, al caracterelor genetice ale şoarecilor NZW care fac boala lupică etc. De exemplu, în spondilita ankilozantă este o frecvenţă crescută a antigenelor HLA-B27, în scleroza multiplă a HLA-B8, în psoriazis a HLA-B13 etc. În sfârşit, pot interveni şi alţi factori. Se afirmă de pildă că IL-2 secretată în exces de către limfocitele *T* activate ar contribui la distrugerea organelor ţintă, dozele mari de IL-2 favorizând dereglarea sistemelor de control ale reacţiilor imune.

Dar oare procesul de autodistrugere se rezumă numai la mecanismele înalt specifice, realizate de către clonele de limfocite *T* sau *B* autoreactive? În procesele de lezare a unor organe sau ţesuturi, în afară de limfocite pot interveni şi celulele *NK*, macrofagele, mastocitele şi chiar granulocitele PMN. Astfel, în artrita reumatoidă este o hiperactivitate a limfocitelor *B*, cu sinteza activă de imunoglobuline din clasele IgG, IgM şi IgE, în special în fazele timpurii ale bolii. În general, activarea policlonală a limfocitelor *B* poate duce la hiperproducţie de anticorpi şi la formarea de complexe imune. În sindromul Sjögren, caracterizat prin modificări inflamatorii ale glandelor exocrine, sunt infiltrări ale acestor glande cu monocite care pot avea un rol important în progresia bolii. În scleroza multiplă şi în *Lichen planus*, o boală inflamatorie cronică cu etiologie necunoscută, activitatea

citotoxică a celulelor *NK* este scăzută, de unde probabil şi capacitatea redusă a organismului de distrugere a unor celule efectoare a agresiunii. În lupusul eritematos sistemic şi în scleroza multiplă, sunt anomalii funcţionale ale granulocitelor PMN manifestate printre altele printr-o eliberare mare de molecule toxice de oxigen. De aceea, poate că "autoimunitatea" ar trebui încadrată în grupa mare a proceselor patologice de "autoagresiune", rezultantă a dereglărilor survenite fie la nivelul unor populaţii de celule efectoare, fie în procesele de instalare şi menţinere în limite normale a cooperărilor celulare şi a mecanismelor de control ale funcţiilor lor.

Autoimunitatea nu este în fond altceva decât o reacţie imună realizată pe principiile răspunsului imun şi cu mijloacele specifice acestuia, dar orientate spre "ţinte" care aparţin propriului organism. Dar şi reacţiile de hipersensibilitate, de exemplu, recunosc aceleaşi mecanisme efectoare ca şi răspunsul imun normal, cu singura deosebire că se desfăşoară la alte grade de intensitate.

Ce deosebire fundamentală există de pildă între poliartrita reumatoidă, o boală autoimună sistemică, şi astmul bronşic infecţios, o boală alergică? Şi într-un caz şi în celălalt, se instalează leziuni tisulare provocate de către celulele citotoxice *T* dar şi de către granulocitele PMN activate, care nu-şi mai pot controla riguros potenţialul lor de eliberare a moleculelor de oxigen toxic, "arzând" atât celulele distruse cât şi pe cele normale, amplificând în felul acesta procesul lezional. Exemplele ar putea continua, de unde concluzia că "graniţele" între normal şi patologic, pe de o parte, şi între diferitele manifestări clinice ale "patologicului", pe de altă parte, sunt relative. De aceea, singura noastră cale de a înţelege şi manipula procesele biologice, pe care le etichetăm poate că nu întotdeauna foarte justificat drept normale sau patologice, este studierea lor şi încercarea de descifrare în profunzime a mecanismelor care le generează.





# MODULAREA NESPECIFICĂ A RĂSPUNSULUI IMUN

Rezultatele cercetărilor experimentale din ultimele trei-patru decenii au demonstrat fără echivoc faptul că recunoaşterea şi eliminarea specifică a structurilor străine de organism se face într-o manieră înalt specifică. Elementele care efectuează această recunoaştere şi eliminare, respectiv efectorii funcţiilor imune sunt alcătuiţi din diferite populaţii de celule sau molecule care acţionează specific sau nespecific. Astfel, efectorii limfocitari şi imunoglobulinici recunosc specific determinanţii antigenici: în cazul limfocitelor prin intermediul receptorilor de membrană pentru antigene, iar în cazul imunoglobulinelor prin "situsurile combinative" de la extremităţile $NH_2$ terminale ale moleculei.

Acum nimeni nu mai pune la îndoială temeinicia teroriilor selective asupra răspunsului imun: determinantul antigenic selectează în exclusivitate clona celulară cu receptori specifici, predestinată să-l recunoască şi să-l neutralizeze numai pe el din tot arsenalul de determinanţi antigenici existenţi în natură.

Pe baza specificităţii, această caracteristică majoră a reacţiilor imune, au fost şi sunt folosite, în scop terapeutic sau profilactic, diferite instrumente de luptă de genul serurilor imune, vaccinurilor, liniilor celulare, anticorpilor monoclonali etc., care au permis combaterea multor boli infecto-contagioase şi cu ajutorul cărora se speră să se poată interveni eficient în unele stări de autoagresiune, în deficite imune etc. Se poate afirma că, în momentul de faţă, infecţiile bacteriene şi cele parazitare pot fi bine stăpânite şi relativ uşor controlate. Practicienii şi clinicienii pot preveni bolile contagioase şi pot trata infecţiile bacteriene cu ajutorul antibioticelor. Chiar şi infecţiile parazitare pot fi tratate cu ajutorul diverselor substanţe antiparazitare.

Cu totul altfel se pune problema în cazul unor infecţii virale şi în special în cazul bolilor neoplazice, indiferent dacă acestea din urmă sunt induse de virusuri oncogene sau recunosc etiologii nevirale. În ciuda eforturilor depuse de-a lungul anilor, terapia unor infecţii virale cum ar fi sindromul de imunodeficit dobândit AIDS şi a proceselor maligne nu a înregistrat progrese vrednice de menţionat.

Dar, observaţiile experimentale şi clinice au demonstrat că, în afară de reacţiile specifice şi care antrenează o clonă limfocitară unică sau un număr restrâns de clone, elementele sistemului limfoid pot fi activate şi nespecific sau "policlonal", situaţie în care sunt implicate aproape toate clonele celulare. Astfel activate, ele devin mai eficiente în protejarea organismului faţă de o gamă largă de agresori. Acest proces, în care sunt antrenate nespecific un mare număr de clone celulare care ating parametrii optimi de funcţionare, se numeşte "modulare nespecifică a răspunsului imun" sau "imunomodulare", iar agenţii care-l generează sunt cunoscuţi sub denumirile sinonime de "imunomodulatori", "imunoactivatori",

"imunorestauratori", "modificatori ai răspunsului biologic (BRM = "biological response modifiers") etc.

Imunomodulatorii au o sferă largă de aplicabilitate în terapeutica sau profilaxia unor boli cronice, ei realizând readucerea funcţiilor imune ale organismului în limite normale sau, altfel spus, contribuind la menţinerea homeostaziei acestuia şi la terapia unor boli cronice (tabelul 127).

*Tabelul 127*

**Unele boli care beneficiază de terapia imunomodulatoare (după J.W.Haden)**

| Agentul imunomodulator | Ţara | Caractere chimice, sursă | Utilizare clinică |
|---|---|---|---|
| *Activatori ai macrofagelor* | | | |
| Picibanil | Japonia | Extract din *Streptococcus pyogenes* | Cancer |
| BCG | USA, ţările Europei | *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) | Cancer al vezicii urinare |
| Krestin | Japonia | Polizaharid fungic | Cancer gastric şi cu alte localizări |
| Lentinan | Japonia | Polizaharid fungic | Idem |
| Biostim | Europa | Extract din *Klebsiella pneumoniae* | Infecţii cronice |
| Bronho-Vaxom | Europa | Extract din opt bacterii | Idem |
| *Activatori ai celulelor T* | | | |
| Timostimulina | Europa | Extract peptidic timic | Cancer şi infecţii cronice |
| T-activin | Rusia | Idem | Idem |
| Thym-Uvocal | Germania | Idem | Idem |
| Thymomodulin | Italia | Idem | Idem |
| *Alţi activatori* | | | |
| Romurtide | Japonia | (Lys $^{18}$) muramyl-dipeptid | Regenerarea măduvei osoase |
| Thymopentin TP-5 | Italia şi Germania | - Pentapeptid | Artrita reumatoidă, infecţii, cancer |
| Levamisol | USA, Ungaria | - Phenylimido-thiazole | Cancer |
| Inosine pranobex | Europa | - Complex de săruri ale inosinei | Infecţii cronice |
| Poly AU | Franţa | - Polinucleotid dublu catenar al acizilor adenilic şi uradylic | Cancer al sânului |

Conceptul practic şi teoretic de stimulare nespecifică a răspunsului imun a fost generat de numeroase observaţii emiprice referitoare la efectul binefăctor asupra organismului exercitat de către unele substanţe organice sau anorganice. Multe metode terapeutice empirice, bazate pe stimularea nespecifică a mijloacelor de apărare imună sau neimună a organismului, se practică şi astăzi cu succes,

demonstrându-şi în acest fel valabilitatea. Este cazul terapiei revulsive care folosea şi mai foloseşte badijonarea cu tinctură de iod, alcool sau cu diverse alte iritante şi care, datorită vasodilataţiei şi afluxului leucocitar provocat, au efecte salutare în afecţiuni "a frigore" sau de altă natură. Tot în acest context pot fi amintite autohemoterapia, ventuzele constituind o formă comodă şi simplă de aplicare a ei, galactoterapia etc. Un pas înainte, atât în ce priveşte îmbogăţirea arsenalului de mijloace terapeutice, cât şi sub raportul dezvoltării cunoştinţelor imunologice, îl reprezintă descoperirea şi introducerea în clinică a terapiei imunomodulatoare.

## RELAŢIA INFECŢIE – IMUNOMODULARE

Imunostimularea nespecifică, cauzată de diverse procese infecţioase, a fost remarcată de multă vreme. În ultimii 250 de ani, a fost semnalată în repetate rânduri influenţa binefăcătoare a infecţiilor şi inflamaţiilor sau febrei provocate de către acestea. Încă înainte de anul 1744, SCHWENKE (citat de N.C.NAUTS) descria efectul unui banal abces asupra evoluţiei unei tumori mamare. Un carcinom mamar, cu prognostic şi evoluţie foarte gravă, a început să regreseze în momentul apariţiei accidentale a unui abces localizat la un picior. Pe măsură ce abcesul şi supuraţia se accentuau, tumora regresa, ajungându-se în cele din urmă la dispariţia ei totală. După vindecarea abcesului, însă, ea a reapărut, pentru ca să dispară din nou în urma provocării voite a unui alt abces. Ulterior, numeroase publicaţii au semnalat antagonisme între diferite forme de cancer şi tuberculoză, sifilis, infecţii stafilococice, streptococice etc. Pe baza acestor observaţii a fost lansată ipoteza conform căreia o cauză majoră a creşterii actuale a incidenţei bolilor neoplazice ar constitui-o succesele obţinute în combaterea bolilor infecţioase. Într-adevăr, unele statistici sugerează de exemplu că, pe măsură ce scade numărul cazurilor de tuberculoză sau de viroze pulmonare, creşte incidenţa cancerului pulmonar (fig. 211). Determinându-se frecvenţa cancerului şi a diferi-

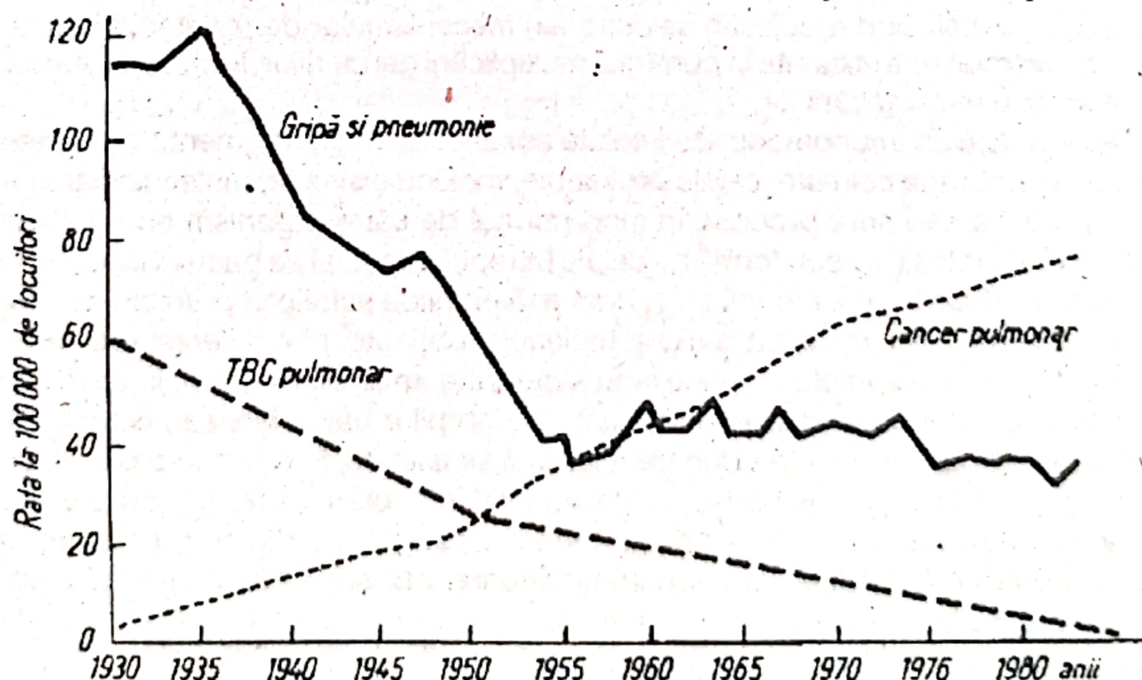



Fig. 211. Cauza deceselor la bărbaţii din S.U.A. între anii 1930-1980.
A fost înregistrată o relaţie inversă între rata mortalităţii provocată de TBC, pneumonii cu etiologia virală sau bacterială şi cea cu etiologie neoplazică care a înregistrat o creştere continuă (după H. Nauts).

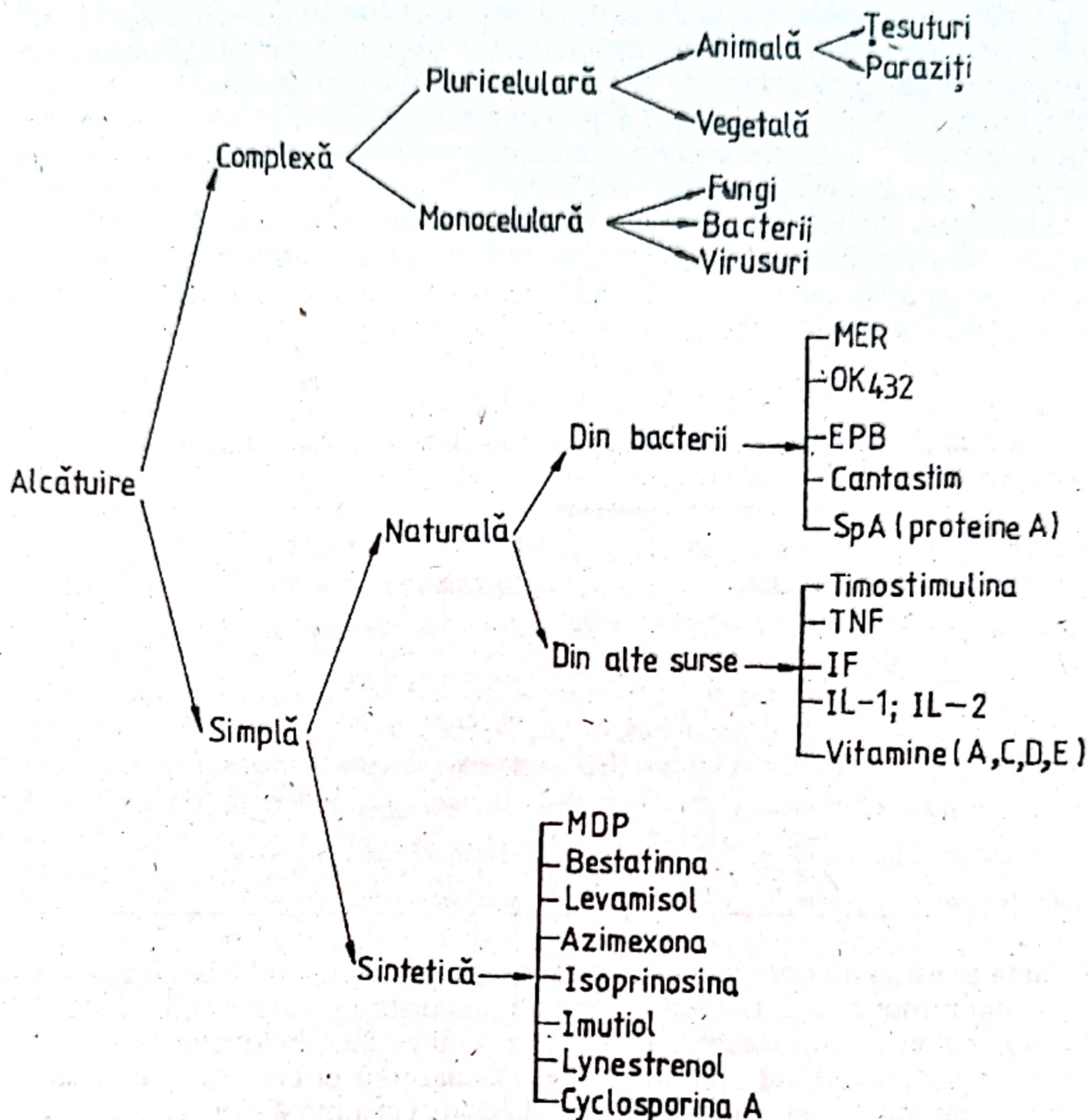
telor infecţii în rândul populaţiilor albă şi de culoare din SUA şi Canada, populaţii diferite între ele prin nivelul de trai, s-a constatat că la indieni, în comparaţie cu albii, mortalitatea datorită cancerului este semnificativ mai redusă, în timp ce frecvenţa infecţiilor banale sau a bolilor infecto-contagioase este de şase ori mai mare decât la albi. La pacienţii din unele ţări subdezvoltate din Africa, melanoamele, cunoscute pentru capacitatea lor de metastazare şi agresivitatea lor, nu metastazează chiar dacă tumora primară se dezvoltă intensiv. De regulă, aceşti pacienţi au boli parazitare sau diverse abcese localizate în diferite regiuni ale corpului şi în special la picioare. Observaţii de acest gen au condus la ideea că incidenţa crescută a cancerului înregistrată în ultimele decenii, în special în ţările dezvoltate sub raport economic, s-ar datora folosirii pe scară largă a antibioticelor care, sterilizând organismul, îl fac să nu mai fie nevoit să-şi folosească mijloacele de apărare imună normale, mijloace care au fost dobândite şi perfecţionate în decursul a milioane de ani de evoluţie. Poate că aceste afirmaţii sunt exagerate dar, în mod sigur, conţin un sâmbure de adevăr. Cert este că datele epidemiologice din ultimii 50 de ani arată că, în ţările dezvoltate, incidenţa bolilor contagioase şi a diverselor forme de infecţii banale a scăzut datorită unui mai bun control al lor prin intermediul vaccinurilor, serurilor imune specifice sau al antibioticelor, pe când cel al bolilor neoplazice a crescut. Poate din această cauză, tot în acest ţări, s-a intensificat cercetarea şi aplicarea practică a imunomodulatorilor nespecifici, SUA iniţiind chiar un program complex şi foarte costisitor de cercetare în acest domeniu, cunoscut sub denumirea de "Program BRM" (Biological Response Modifiers).

Toţi "modificatorii răspunsului biologic" sunt agenţi care modifică relaţia dintre organismul gazdă şi agresorul de natură infecţioasă sau neoplazică, modificând în favoarea gazdei întregul proces biologic care se instalează în astfel de relaţii. Majoritatea acestor "modificatori" sunt "imunomodulatori", agenţi chimici sau biologici care activează funcţiile imune atunci când sunt deprimate, sau le deprimă atunci când funcţionează intens. Terapia cu astfel de agenţi se numeşte "imunoterapie", ea realizând modificări salutare ale mecanismelor de rezistenţă imună, care devin mult mai eficiente în controlul multiplicării germenilor, formării tumorilor primare sau metastazării lor.

Acţionează ca imunomodulatori celule eukariote întregi, fragmente de perete sau de membrane celulare, celule prokariote, molecule simple, molecule care nu sunt produse sau sunt produse în mod normal de către organism etc. (tabelul 128). Ei sunt folosiţi fie sub formă de celule întregi, în special ca bacterii inactivate, fie sub formă de fragmente celulare, cum ar fi de pildă scheletul peretelui celular sau ribozomii, sau chiar ca simple molecule obţinute prin diferite procedee chimice direct din sursele naturale, sau sintetizate artificial. De altfel, în ultimii 20 de ani, s-a trecut de la utilizarea în practică a corpilor bacterieni sau extractelor bacteriene, la strategii de producere a lor mai sofisticate, folosindu-se o selecţie largă de compuşi activi din punct de vedere imunofarmacologic, cu diverse acţiuni asupra sistemului imun. Multe dintre aceste preparate sunt utilizate nu numai pentru proprietăţile lor imunomodulatoare, dar şi ca adjuvanţi ai răspunsului imun, cu aplicabilitate practică în stimularea sintezei anticorpilor în cursul imunizărilor pentru obţinerea de seruri hiperimune.

Deci, imunomodulatorii au o structură simplă (moleculară) sau complexă (tisulară sau celulară), pot proveni din surse naturale sau din sinteză, find obţinuţi ca produşi biologici de origine virală, bacteriană, fungică, vegetală sau animală, sau ca produşi chimici.

**Originea şi complexitatea structurală a unor imunomodulatori**




## IMUNOMODULATORI NATURALI, DE ORIGINE BIOLOGICĂ

### Bacterii utilizate ca imunomodulatori

W.B. COLEY poate fi considerat pionierul terapiei nespecifice cu produse de origine bacteriană deoarece, încă din anul 1883, a încercat tratarea unor cazuri inoperabile de cancer, provocând infecţii cu diverşi germeni şi introducând în practică vaccinurile bacteriene mixte MBV ("mixed bacterical vaccines").

Un fapt experimental care a avut loc în anul 1959 a stimulat cercetarea teoretică şi aplicarea în practica terapeutică a bacteriilor ca stimulatori nespecific. Unele colective de cercetare din Franţa, lucrând independent, au constatat că şoarecii şi şobolanii trataţi cu BCG (Bacillus Calmette-Guérin) devin tot mai rezistenţi faţă de limfoamele maligne. Efecte similare au fost constatate şi în cazul transplantării *in vivo* a liniei tumorale $L_{1210}$, aceasta dezvoltându-se mai lent la animale pretratate cu BCG. Cam în acelaşi timp se demonstrează experimental că şi *Corynebacterium parvum* (denumit ulterior *Propionibacterium*) are efecte stimulatoare nespecifice. În anii care au urmat, numărul germenilor incriminaţi a avea astfel de efecte a crescut considerabil, cuprinzând atât specii patogene, cât şi specii condiţionat patogene sau total inofensive (tabelul 129).

În favoarea efectelor stimulatoare nespecifice provocate de către bacterii, în afară de datele experimentale şi de observaţiile empirice, pledează şi unele studii epidemiologice. De exemplu, incidenţa leucemiilor este mult mai scăzută la copiii vaccinaţi BCG în comparaţie cu cei nevaccinaţi.

*Tabelul 129*

**Diferite specii de germeni utilizaţi pentru proprietăţile lor imunomodulatoare**

| | |
|---|---|
| *Bacillus megaterium* | *Lactobacillus bulgaricus* |
| *Bacillus Calmette-Guerin (BCG)* | *Lactobacillus casei* |
| *Brucella abortus* | *Listeria monocytogenes* |
| *Candida albicans* | *Micrococcus lysodeikticus* |
| *Candida neoformans* | *Mycobacterium leprae murinum* |
| *Corynebacterium parvum* | *Mycobacterium smegmatis* |
| *Coxiella burnetti* | *Nocardia rubra* |
| *Klebsiella pneumoniae* | *Pseudomonas aeruginosa* |
| *Lactobacillus acidophilus* | *Staphylococcus aureus* |

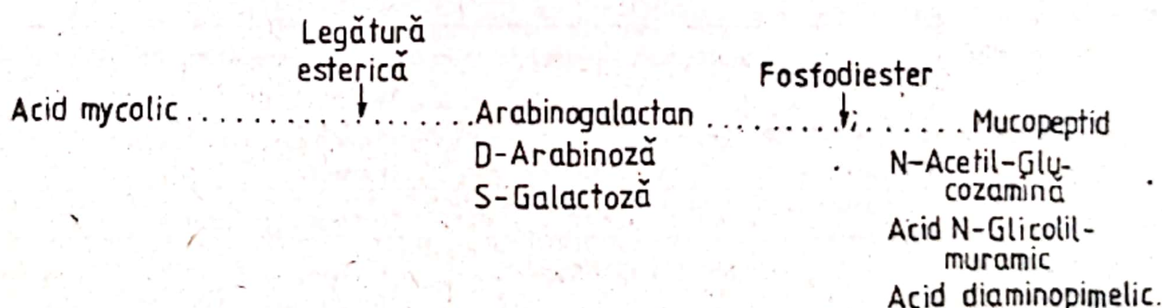
Toate acestea au generat optimism şi speranţe, antrenând o largă aplicare a preparatelor mono- sau polimicrobiene ca stimulatori nespecifici, în special în clinica oncologică. Administrarea lor terapeutică se face în funcţie de germenii folosiţi ca stimulatori, de tipul tumorii, de localizarea ei etc. Sunt administraţi "intralezional" sau "intratumoral" fiind inoculaţi direct în tumoră, sunt utilizaţi pentru tratament "sistemic" prin inoculări subcutanate, intramusculare, intradermice etc. Pot fi administraţi "profilactic" sau "terapeutic" adică înainte de apariţia tumorii sau după dezvoltarea ei. Sunt inoculaţi ca suspensii bacteriene inactivate, sub formă de suspensii uleioase, în asociere cu antigenele tumorale etc. De exemplu, BCG dă bune rezultate când este inoculat intrapleural la pacienţii cu cancer pulmonar, sau intravezical la cei cu tumori ale vezicii urinare. De asemenea, ar avea unele efecte benefice în melanomul cutanat. Au fost şi mai sunt încă folosite preparate mono- sau polimicrobiene cu diferite denumiri comerciale ca *Omnadin, Polidin, Reactin, Ducton, Eu 4800, Prodigiosan, Stomasina, BCG-F, Lantigen* etc.

Dar, nici până în prezent nu sunt bine cunoscute schemele optime de tratament, dozele, căile de inoculare, intervalul dintre inoculări etc. Mai mult, unele date bazate pe cercetări imunologice riguroase semnalează apariţia unor efecte nedorite induse de către imunostimulatorii bacterieni, dintre care cea mai evidentă este imunosupresia exprimată printre altele şi prin favorizarea creşterii tumorilor

în loc de inhibiţia dezvoltării lor. Specia sau chiar tulpina bacteriană folosită ca imunomodulator poate fi un factor hotărâtor de influenţare a acestui efect. De exemplu, la *Corynebacterium parvum* au fost constatate diferenţe marcante în activitatea imunostimulatoare în relaţie cu tulpina de germeni utilizată. Este foarte posibil ca specia sau tulpina bacteriilor să condiţioneze proporţia dintre factorii activatori şi depresori ai reacţiilor imune, existenţi la nivelul celulei bacteriene. Pentru evitarea efectelor nedorite pe de o parte, şi pentru amplificarea efectului stimulant pe de altă parte, s-a recurs la folosirea unor substanţe simple din punct de vedere structural, provenite din bacterii sau din alte surse. S-a reuşit obţinerea de preparate purificate de "generaţia a II-a", a "III-a" sau chiar de "generaţia a IV-a", cu structură chimică simplă şi bine cunoscută, lipsite de componentele inutile sau chiar nocive care formează "balastul" celulei bacteriene întregi.

**Extracte de origine bacteriană**

De regulă, au o greutate moleculară mică, exercită aceleaşi efecte stimulatorii ca şi celula bacteriană, dar sunt lipsite de efectele secundare ale acesteia. Mare parte dintre aceste componente sunt localizate în peretele bacterian, motiv pentru care, în unele situaţii, este suficientă inocularea pereţilor celulari pentru obţinerea activării funcţionale a sistemului imun. La mycobacterii, de exemplu, peretele bacterian are acţiune adjuvantă, putând substitui bacteria. Mycobacteriile, Corynebacteriile, Nocardiile etc. conţin în pereţii lor *6,6'-diestertrehaloză* cu diferiţi $\alpha$- şi $\beta$–hidroxiacizi, denumiţi "acizi micolici" care pot forma "*trehalose dymicolat*" (TDM) sau "Cord factor" cu remarcabile proprietăţi imunostimulente. De exemplu, şoarecii inoculaţi experimental cu "Cord factor" rezistă mai bine la infecţii cu germenii patogeni decât martorii netrataţi. Componenta stimulatoare din peretele celular al mycobacteriilor ar fi alcătuită din două părţi distincte, şi anume: dintr-un *mycolat de arabinogalactan,* care este legat printr-un *fosfodiester* la un *peptidoglycan,* realizând următoarea structură peptidoglicolipidică:




Peptidoglicanul peretelui celular al mycobacteriilor este *N-acetil-muramil-L-anil-D-izoglutamină,* cunoscut sub denumirea comercială de "Muramil dipeptid" (MDP), care a fost realizat şi sintetic şi care are o marcantă activitate imunomodulatoare. Atunci când este inoculat o dată cu antigenul, stimulează sinteza anticorpilor, dovedind prin aceasta şi proprieţăţi adjuvante. De asemenea, stimulează creşterea rezistenţei nespecifice a organismului faţă de bacterii, virusuri, paraziţi, activează sinteza unor limfokine sau monokine (IL-1; IL-2), exprimarea receptorilor pentru IL-2 pe suprafaţa limfocitelor *T* activate etc.

Au mai fost identificate şi alte componente active din pereţii bacteriilor. Este cazul substanţei MER (*methanol extraction residue,* sau reziduul extractului metanolic) obţinută prin tratarea celulelor BCG cu acetonă şi metanol şi care

conţine atât fragmente de perete celular cât şi "cord factor", al extractului fosfolipidic realizat din *Lysteria monocytogenes* (EPB), lipopolizaharizilor (LPS) obţinuţi din germeni Gram-negativi, peptidoglicanilor etc. (tabelul 130). Recent, noi am reuşit să identificăm într-o tulpină foarte patogenă de *Pseudomonas aeruginosa* existenţa unor fosfolipide care nu sunt prezente în mod normal la nivelul acestor bacterii. Moleculele s-au dovedit a avea remarcabile proprietăţi imunomodulatoare, preparatul comercial cu denumirea de "Cantastim" realizat pe baza acestora (*Cantastim* = Cantacuzino stimulent) dând rezultatele bune atunci când este administrat la pacienţi cu imunodepresii, deoarece activează funcţiile macrofagelor, ale limfocitelor *Tc*, celulelor *NK*, normalizează funcţiile celulelor *Th* şi *Ts*, echilibrează raportul normal dintre diferitele subpopulaţii de celule etc.

*Tabelul 130*

**Unii compuşi naturali de origine bacteriană cu activitate imunostimulatoare**

| Denumirea compuşilor | Sursa | Activitatea biologică |
|---|---|---|
| CPS-K (polizaharizi capsulari) | *Klebsiella pneumoniae* | Adjuvant în sinteza de anticorpi |
| Cord factor | Diverşi germeni | Imunostimulator general |
| EPB (Extract fosfolipidic bacterian) | *Listeria monocytogenes* | Activează fagocitoza şi reactivitatea alogenă |
| Flagelina | Germeni Gram - | Activator policlonal |
| IPM (Interphase material) | *Mycobacterium smegmatis* | Imunostimulator al sistemului reticulo-endotelial (SRE) |
| MER (Methanol extraction residue) | *Mycobacterium tuberculosis* | Imunostimulator al SRE |
| OK - 432 (Picibanil) | *Streptococcus hemolyticus* | Inductor de interferon, inhibitor al tumorilor |
| Cantastim | *Pseudomonas aeruginosa* | Imunoactivator, inhibitor al tumorilor |
| Peptidoglicani | Bacterii diverse | Activatori policlonali |
| LPS (lipopolizaharizi) | Germeni Gram-negativi | Activatori policlonali<br>Adjuvanţi în imunizări |
| SPA (proteina A stafilococică) | *Staphylococcus aureus* | Activator policlonal, activator *NK* * |

* În realitate nu SpA este activator al funcţiilor *NK* ci nişte "impurificări" ale preparatelor comerciale, cu greutatea de 2 kD, care provin probabil din pereţii germenilor.

Din *Klebsiella pneumoniae* au fost izolate nişte glicoproteine cu greutate moleculară mare, denumite comercial *Ru 41740* care *in vitro* activează sinteza IL-1 de către macrofage precum şi sinteza de TNF. *In vivo* dă bune rezultate în infecţiile respiratorii cu etiologie virală sau bacteriană ca urmare a activării unor funcţii ale macrofagelor, granulocitelor PMN, celulelor *NK* şi a limfocitelor *T* şi *B*. Din membrana acestei bacterii au mai fost izolaţi nişte peptidoglicani care sunt activatori policlonali pentru limfocitele *B*.

Un produs de origine bacteriană bine cunoscut este LPS, care activează macrofagele şi este mitogen pentru limfocitele *B* de şoarece acţionând direct asupra acestora, dar şi indirect, via IL-1 eliberat de către macrofage.

Din *S.haemoliticus* japonezii au purificat preparatul *OK-432* cu denumirea comercială de "Picibanil" care, administrat asociat cu unele substanţe citostatice ca de pildă mitomicina C, este foarte eficient în terapia tumorilor. Este un potent inductor al formării şi activării celulelor ucigaşe şi al sintezei de citokine.

Unele preparate se pot administra pe cale orală, fiind deci mai comode pentru pacienţi. Este cazul produsului *OM 89* obţinut din *Escherichia coli,* eficient în prevenirea infecţiilor urinare şi în artrita reumatoidă, mai ales datorită capacităţii sale de modulare a producerii locale de citokine. Stimularea apărării locale la nivelul mucoaselor digestive, şi în special la nivelul celor respiratorii, poate fi de altfel realizată şi cu un preparat comercial, "Bronho-Vaxom" alcătuit din opt extracte bacteriene obţinute din *K.pneumoniae, Diplococcus pneumoniae* etc., care administrat oral dovedeşte a fi foarte eficient.

**Imunomodulatori naturali, de origine animală**

Diverse ţesuturi sau molecule de origine animală pot fi utilizate nu numai ca agenţi terapeutici specifici sau selectivi, dar şi ca imunomodulatori. Este cazul "tuftsinei", un tetrapeptid bazic cu largi implicaţiii biologice, al unor preparate din sânge sau din timus etc. Au largă utilizare unii hormoni timici care pot influenţa maturarea limfocitelor *T,* ba chiar şi imunoglobulinele administrate pe cale intravenoasă. Acestea trebuie să fie lipsite de virusuri patogene (HbS, HIV), să aibă un spectru larg de activitate, adică să conţină toate subclasele de IgG, dar să nu conţină IgE sau IgA, pentru a nu provoca şoc anafilactic la pacienţii cu deficit de IgA, şi să nu fie administrate la subiecţii cu crioglobulinemie. Imunoglobulinele au efecte benefice nu numai atunci când sunt administrate în infecţii şi în imunodeficite primare, situaţii în care pot fi administrate în doze de 300 - 500 mg/kg de greutate corporală o dată la 3 - 4 săptămâni, dar şi în boli autoimune, ca de pildă în purpura idiopatică trombocitopenică. Administrarea lor modulează funcţiile limfocitelor *T* şi *B* la pacienţii cu boala Kawasaki (o boală acută, febrilă, la copii cu anevrism coronarian), în myastenia gravis, artrita reumatoidă, diabetul juvenil etc.

Neuropeptidele, ca de pildă endorfinele şi enkefalinele, stimulează sinteza de IFN-$\alpha$, de IL-2, activează funcţiile *NK*, comportându-se ca adevăraţi imunomodulatori. Enkefalinele modulează răspunsul imun umoral şi celular într-o relaţie dependentă de doză: dozele mari suprimă, iar cele mici potenţează sinteza de anticorpi, degranularea mastocitelor, reacţiile locale de hipersensibilitate etc. *Metenkefalina* întârzie dezvoltarea melanomului cutanat şi ameliorează infecţii cu HIV realizând o creştere tranzitorie a numărului de limfocite *T CD*$4^+$ şi a răspunsului la stimulii mitogenici.

Recent, se încearcă utilizarea ca agenţi imunomodulatori a unor monokine şi limfokine cum ar fi IL-1, IL-2, TNF, IFN-$\alpha$, IFN-$\gamma$, factorul de necroză a tumorilor (TNF), factorul de creştere a limfocitelor *B* (BCGF), de stimulare a coloniilor (CSF) etc. Aceştia acţionează ca nişte semnale extracelulare capabile să restaureze multe funcţii imune. Trebuie totuşi făcută o menţiune referitoare la aceşti imunomodulatori naturali. Dacă cei de origine bacteriană sau vegetală sunt de provenienţă exogenă, monokinele şi limfokinele sunt produse ale organismului, fabricate în mod normal de către acesta. Utilizarea lor îşi găseşte justificare numai în acele situaţii în care sinteza lor, de către organismul pacientului la care urmează

să fie administrate, este defectuoasă. În caz contrar, ele sunt eliminate fără ca organismul la care au fost inoculate să poată "beneficia" de ele. Dar, pentru a cunoaşte care este nivelul producţiei lor interne, este necesară dozarea, la fiecare pacient, a acestora. Desigur, operaţia nu este simplă, dar este absolut necesară, deoarece există riscul instituirii unei terapii iraţionale care va da rezultate negative şi va genera concluzii eronate. Mai mult, este absolut necesar ca să se cunoască modul de exprimare a receptorilor pentru citokinele folosite ca imunomodulatori la nivelul membranei plasmatice, deoarece există riscul ca să fie administrate, fără ca celulele care ar trebui să primească semnalele transmise de ele să poată recepţiona mesajele.

**Alte surse de imunomodulatori naturali**

Diverse substanţe, de origine animală, vegetală, fungică, au marcante proprietăţi imunomodulatoare. Unele vitamine, cum ar fi vitaminele A, C, D, E, datorită capacităţii lor de activare nespecifică a funcţiilor citotoxice ale limfocitelor *Tc* sau ale celulelor *NK,* de normalizare a mecanismlor de cooperare celulară, au o largă utilizare ca imunomodulatori în bolile neoplazice sau de altă natură. De exemplu, aproape toate celulele vertebratelor au receptori pentru vitamina D care ar avea un important rol imunoreglator. Astfel de receptori sunt pe monocite şi pe limfocitele activate, dar nu pe limfocitele în repaus. Monocitele activate pot converti *25-hidroxivitamina D3 (25 OHD),* forma relativ inactivă a vitaminei D, în *1-$\alpha$, 25'-dihidroxi vitamina D3,* sau "calcitriol", forma biologic activă a acesteia, care poate modula celulele sistemului imun după legarea ei la receptorii specifici de la nivelul nucleului. Calcitriolul modulează funcţiile monocitelor şi macrofagelor, activându-le producţia de monokine (TNF, IL-1, $PGE_2$), protejându-le de efectul stres-ului termic şi blocându-le producţia de IFN care poate inhiba mobilizarea $Ca^{2+}$ din oase. De asemenea, metaboliţii vitaminei D influenţează maturarea şi diferenţierea extratimică a limfocitelor *T,* iniţial activând populaţia *T* şi ulterior inhibând-o. După părăsirea timusului şi pătrunderea lor în circulaţie, limfocitele *T* îşi pierd receptorii pentru vitamina D. Vitamina A şi în special acizii retinoici, vitamina C, prin efectul lor antioxidant, sunt modulatori eficienţi în imunodepresii şi în special în cele asociate cu boala canceroasă.

Din diferite plante, ca de pildă din *Angelica sinensis* sau din *Cynancus auriculatus,* au fost obţinute extracte care stimulează sinteza de IL-2. Din vâsc, a fost extras un preparat cu denumirea comercială de "Iscador", din orz verde se extrage o enzimă cu activitate asemănătoare superoxiddismutazei (SOD) care blochează eliberarea de $O_2^-$ şi $OH^-$ de către granulocitele PMN, din *Symphytum officinale* a fost obţinută o fracţiune bogată în principii care modulează unele funcţii ale PMN etc.

**Imunomodulatori cu structură chimică bine definită**

Aparţin aşa-numitelor "generaţia a III-a" sau "a IV-a", au o structură chimică simplă şi pot fi obţinuţi prin sinteză chimică sau prin tehnologii genetice de genul ADN recombinat. Ca atare, pot fi produşi în cantităţi mari şi în condiţii riguroase de control al structurii lor. În general, această structură este asemănătoare, putând merge până la identitate, cu cea a compuşilor naturali, dar există şi produse sintetice care nu au nici o relaţie structurală cu produsele naturale (tabelul 131).

*Tabelul 131*

**Imunostimulanţi definiţi chimic, utilizaţi în clinică (după J.W. Hadden)**

| Imunomodulatorul | Mod de acţiune | Activ în |
|---|---|---|
| *Derivaţi ai muramil-dipeptidului* | | |
| - Murabutidul | Activează macrofagele | Cancer, infecţii |
| - Muramil tetrapeptid-fosfatidil-etanolamină (în lipozomi) | Activează macrofagele | Cancer |
| *Analogi ai lipidului A* | | |
| - Monofosforil-lipid A | Activează macrofagele şi limfocitele *B* | Adjuvant |
| - DT 5461 | Idem | ? |
| Ubenimex | Activează macrofagele şi celulele *NK* | Cancer |
| *Peptide* | | |
| - Timozina $\alpha$1 | Maturarea celulelor T | Cancer, hepatite |
| - Factorul umoral timic (THF) | Idem | HIV |
| - Tuftsina | Stimulează macrofagele, celulele *NK*, granulocitele PMN | Infecţii |
| *Substanţe timomimetice* | | |
| - Ditiocarb | Stimulează macrofagele celulele *NK*, PMN | HIV |
| - ST 789 | Idem | Infecţii |
| - Metil inozin-monofosfat | Idem | HIV şi infecţii |
| - Azimexona (Imexona) | Stimulează limfocitele *T* şi macrofagele | HIV |
| *Inductori de interferoni* | | |
| - Ampligen | Activează macrofagele şi celulele *NK* | Cancer, HIV |
| - Bropirimin | Idem | Cancerul vezicii urinare |

Compuşi sintetici care au generat mari speranţe pentru terapia anticanceroasă, din care cauză au fost foarte bine studiaţi, sunt printre alţii şi Levamisolul (Decaris-ul produs în Ungaria) şi MDP (Muramyldipeptid). Levamisolul hidrocloric, un izomer al tetramisolului, cu greutatea moleculară de 240, 75 D (0,240 kD), este un antihelmintic sintetic foarte activ contra nematodelor. În anul 1971 a fost semnalată capacitatea sa de a proteja şoarecii infectaţi cu tulpini patogene de *Brucella* şi de a inhiba dezvoltarea tumorilor maligne solide. El influenţează mecanismele de apărarea aflate în hipofuncţie imună datorită vârstei înaintate sau datorită unor boli, modulând în special răspunsul imun mediat celular. Această moleculă mică restaurează funcţiile macrofagelor, limfocitelor *T* şi granulocitelor

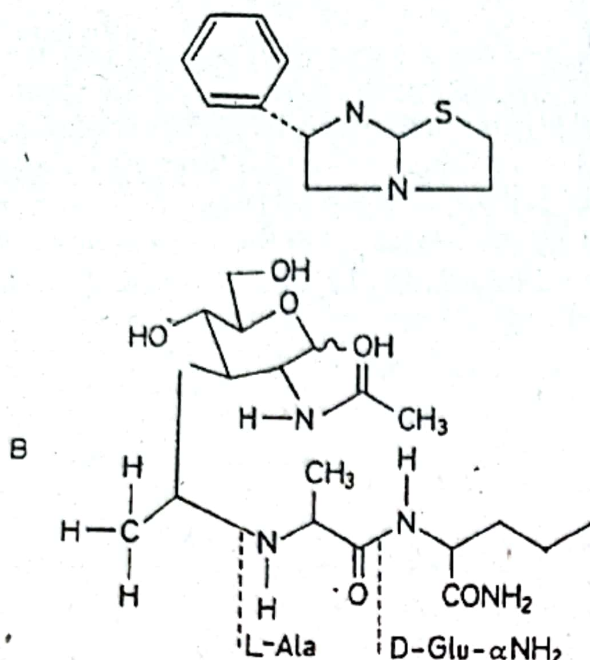



Fig.212. Molecula de Levamisol (A) şi de MDP (N-acetyl-Muramyl-L-Alanyl-D-Isoglutamină) (B) (după J. Symoens şi M. Rosenthal).

PMN, restaurare exprimată printr-o mai activă sinteză şi secreţie de limfokine, prin activarea fagocitozei, chemotaxiei etc. Observaţiile clinice ulterioare, însă, au semnalat instalarea în cursul tratamentului cu Levamisol a unor efecte secundare grave, ca de exemplu granulocitopenia sau chiar agranulocitoză, febră, urticarie, sau chiar lipsa de acţiune asupra funcţiilor imune la pacienţii cu cancere operate sau cu melanoame.

Un alt imunostimulent sintetic cu remarcabile proprietăţi adjuvante şi imunomodulatoare este MDP (fig. 212). Are greutatea moleculară de 0,492 kD şi reprezintă, după cum menţionam anterior, componenta activă din peretele mycobacteriilor care, după ce a fost bine cunoscută din punct de vedere structural, a putut fi realizată şi sintetic. Administrat *in vivo,* MDP potenţează răspunsul imun umoral, induce reacţii de hipersensibilitate întârziată şi măreşte rezistenţa nespecifică a şoarecilor la infecţii. Acţionează în special asupra macrofagelor cărora le activează funcţiile secretorii (cu referire specială la sinsteza şi secreţia de prostaglandine, de colagenază etc.), citostatice şi citotoxice.

Numărul compuşilor sintetici realizaţi şi identificaţi ca imunomodulatori, ca de altfel şi cel al modulatorilor naturali este în continuă creştere, iar modul lor de acţiune este diferit. Unii stimulează atât sinteza de mediatori solubili cât şi funcţiile unor celule efectoare. Este cazul inductorilor de interferon de genul acidului poliinozilic: policitidilic (Poli I:C), tiloronului etc. Alţii, ca de pildă MDP, Tuftsina, Bestatina, acţionează direct asupra unor celule efectoare ale imunităţii, cu referire specială la macrofage, limfocite sau granulocite PMN. Astfel "Isoprinosina", obţinută sintetic din "Inosină" şi sarea acidului *p-aceto-midobenzoic a N-N-dimetil amino-2 propanolol* la raportul molar 1:3, activează proliferarea limfocitelor stimulate de către antigene sau mitogene, producţia de IL-1 şi IL-2, exprimarea receptorilor pentru IL-2, stimulează funcţiile macrofagelor şi celulelor *NK*. "Imuthiolul" (sodium dietildetiocarbamat) prin gruparea "tiol" este asemănător ca structură chimică cu Levamisolul. *In vivo,* activează maturarea protimocitelor şi evoluţia lor rapidă spre limfocite *T* funcţionale care pot răspunde optim la stimulii mitogenici, stimulează activitatea citotoxică a limfocitelor *Tc* şi a celulelor *NK,* activează sinteza de anticorpi. "Danazol", un steroid androgenic, reduce titrul anticorpilor antitrombocitari, fiind eficient în purpura trombocitopenică idiopatică. "COP1", un polimer alcătuit din L-Ala, L-Glu, L-Cys şi L-Tyr (AEKY) cu greutatea moleculară de 23 kD stimulează proteina bazică mielinică, suprimând inducerea experimentală a encefalomielitei alergice. Se pare că ar induce proliferarea unor celule supresoare specifice pentru anumite clone de limfocite *Tc*. "Cyclosporina A" inhibă mecanismele transcripţionale, fiind un imunomodulator util în unele boli autoimune, ca de pildă în diabetul juvenil sau în uveite.

## MODALITĂŢI ŞI CĂI DE ADMINISTRARE A IMUNOMODULATORILOR

Administrarea preparatelor cu astfel de proprietăţi este condiţionată de către o serie de factori, cum ar fi: natura lor, boala care urmează a fi combătută, statusul imun al organismului etc. Într-un fel vor fi administrate nişte preparate polimicrobiene şi în alt fel produsele sintetice cu greutate moleculară mică. Într-un fel vor fi inoculate în cazul unor afecţiuni ale aparatului digestiv sau respirator, de pildă, şi în alt fel în cazul unor leucemii. Cert este că, după cum menţionam anterior, imunoterapia unor tumori poate fi realizată prin inocularea lor direct în tumoră, adică intratumoral sau intralezional, sau în afara ei, adică prin administrare sistemică. Se pot face administrări profilactice sau terapeutice; se poate face o singură administrare sau inoculări repetate, injectându-se un singur preparat sau o combinaţie de astfel de preparate etc.

De regulă, imediat după inocularea imunomodulatorilor, pentru un interval scurt de timp, sunt activate unele funcţii imune şi eventual depresate altele, după care urmează un declin al activităţii, cu revenirea acestor funcţii la nivelul existent înainte de inocularea lor, sau chiar sub acest nivel (fig. 213).

În cazuri previzibile de stres, sau în cazul unor afecţiuni virale acute, poate fi suficientă o singură administrare. În deficite imune cronice asociate cu bolile neoplazice sau cu unele infecţii cronice, se pot practica administrări prelungite, timp de 2 - 3 luni de zile, dar intervalul dintre acestea să nu fie mai mic de 7 - 10 zile. Dacă inoculările se fac la un interval de timp mai scurt, atunci ele au toate şansele să se adreseze unui organism care are deja funcţiile stimulate spre limitele superioare, limite care practic nu mai pot fi depăşite. Ca atare, urmează efectul contrariu celui dorit, adică de inhibiţie prin exces de stimul şi anularea efectelor terapiei instituite sau chiar agravarea bolii. Bineînţeles, o administrare corectă a imunomodulatorilor trebuie să se bazeze în primul rând pe date obiective referitoare la mecanismele lor de acţiune şi, dacă este posibil, pe cunoaşterea exactă a status-ului imun al pacientului la care se impune aplicarea terapiei sau profilaxiei cu modulatori. Trebuie subliniat faptul că o cunoaştere reală a potenţialului imun al organismului nu poate fi realizată numai prin estimarea titrului anticorpilor serici faţă de unele bacterii sau virusuri. Este necesară investigarea unor celule efectoare ale imunităţii mediate celular, aprecierea funcţiilor macrofagelor, a limfocitelor etc. (tabelul 132). Numai un studiu complex şi o evaluare a cât mai multor funcţii imune poate fi într-adevăr eficientă.

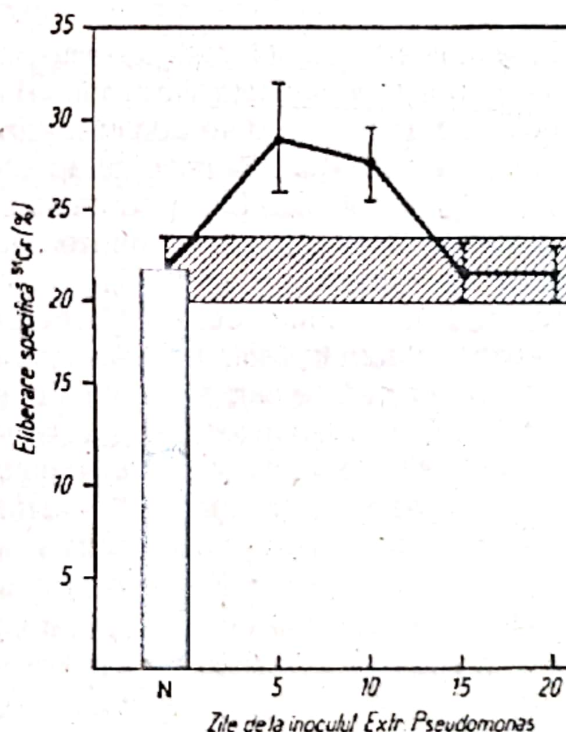



Fig.213. Nivelul funcţiei NK în splina şoarecilor la diferite intervale de timp de la inocularea i.p. a produsului Cantastim obţinut dintr-o tulpină patogenă de *Pseudomonas aeruginosa*. Activitatea citotoxică a celulelor *NK* a fost evaluată prin testul cu $^{51}$Cr, celula ţintă fiind linia YAC1 marcată radioactiv (valorii medii +DS).

**Unele constante şi funcţii imunologice care pot fi evaluate de rutină într-un laborator cu dotare materială medie**

| |
|---|
| 1. Numărul de limfocite/ml sânge după separarea lor prin centrifugare în gradient (Ficoll-Isopaque) |
| 2. Numărul granulocitelor PMN/ml sânge, după separarea lor prin centrifugare în gradient de densitate (Ficoll-Isopaque) |
| 3. Activitatea citotoxică NK asupra celulelor ţintă din linii mieloide sau eritroleucemice marcate radioactiv, evaluată ca procent de eliberare specifică a $^{51}Cr$ |
| 4. Activitatea citotoxică ADCC asupra unor celule ţintă care au fixat specific anticorpii, evaluată ca procent de eliberare specifică a $^{51}Cr$ |
| 5. Procentul limfocitelor *T* care exprimă receptori pentru eritrocite de oaie (*CD* 2) estimat prin tehnica rozetelor E |
| 6. Procentul limfocitelor T supresoare (cu *CD* 2 termostabil) evaluat prin tehnica rozetelor E45 |
| 7. Eliberarea $O_2^-$ de către granulocitele PMN nestimulate şi stimulate în diverse condiţii (zimozan opsonizat, concanavalină A, fitohemaglutinină etc.) |
| 8. Proliferarea limfocitelor *T* stimulate policlonal (mitogenic) sau clonal (antigenic) *in vitro,* în diferite condiţii de cultivare |
| 9. Estimarea funcţiilor fagocitare, opsonică şi neopsonică, a macrofagelor şi PMN |
| 10. Inhibiţia migrării macrofagelor (metoda indirectă) |

Bineînţeles că acest număr de teste poate fi amplificat. Trebuie de subliniat că imunomodulatorii, ca multe alte produse biologice sau chimico-farmaceutice, sunt mai eficace atunci când se administrează "preventiv", "profilactic", decât atunci când sunt administrate curativ, "terapeutic", afirmaţia fiind valabilă în special în cazul bolilor neoplazice. Este bine ca persoanele care au fost supuse unor factori de stres, femeile la vârsta menopauzei sau după această vârstă, oamenii aparent sănătoşi dar care sunt mai "sensibili" la afecţiuni "a frigore" sau care din când în când fac pusee acute de infecţiii herpetice, cel puţin o dată într-un an să primească, o dată la 7 zile (adică săptămânal), timp de 8-10 săptămâni, câte o fiolă de Cantastim pe cale subcutanată, sau două fiole de Polidin pe cale intramusculară. O asemenea terapie "profilactică" este foarte indicată şi pentru femeile care au suferit intervenţii chirurgicale pe sân sau uter, chiar dacă acestea vizau eliminarea unor formaţii "benigne" (mastoză chistică etc.). O asemenea conduită previne multe situaţii grave care, dacă se instalează, practic nu mai pot fi anulate.

Imunomodulatorii pot fi administraţi şi în asociere cu unele autovaccinuri. Această manieră de tratament este foarte indicată şi dă bune rezultate în infecţiile cronice stafilococice, streptococice, herpetice etc., rebele la terapia uzuală. De regulă, aceşti pacienţi au dereglat raportul normal între subclasa limfocitelor *Ts* şi *Th*, în favoarea celor *Ts*. Stimularea lor cu anatoxine, vaccinuri sau autovaccinuri este ineficientă, deoarece hiperfuncţia celulelor supresoare inhibă uneori până la anulare răspunsul clonelor responsabile cu recunoaşterea şi neutralizarea agresorului respectiv. Asocierea tratamentului specific, adică anatoxina sau autovaccinul, cu imunomodulatorul care acţionează nespecific, administrate pe baza unei scheme judicioase, asigură succesul terapeutic.

## MECANISME FUNDAMENTALE DE ACŢIUNE A IMUNOMODULATORILOR

Imunomodulatorii, în special cei cu structura complexă (molecule mari sau bacterii), pot acţiona şi ca antigene capabile să instaleze o stare de rezistenţă specifică faţă de alte microorganisme înrudite antigenic. De exemplu, BCG conferă protecţie specifică faţă de alte mycobacterii, acţionând în acest caz ca "antigen" şi nu ca "imunomodulator". Dar, animalele tratate experimental cu BCG sau cu derivaţi ai acestuia devin mai rezistente la infecţii cu *Listeria, E. coli* etc., care nu sunt înrudite antigenic cu mycobacteriile. Mai mult, la aceste animale se înregistrează o accelerare a rejecţiei alogrefelor şi o inhibiţie a dezvoltării sau diseminării unor tumori. În aceste cazuri nu mai poate fi vorba de o acţiune specifică, ci de una nespecifică. Din acest punct de vedere, imunomodulatorii ar putea fi clasificaţi în *a) antigenici şi b) neantigenici.*

Ei pot acţiona atât asupra funcţiilor sistemului imun cât şi asupra altor funcţii biologice ale organismului (fig. 214). Mecanismele care stau la baza acestor activităţi sunt complexe şi în mare măsură necunoscute. Se ştie doar că ei activează proliferarea celulară şi intensifică semnificativ cooperările celulare, ca o consecinţă a influenţei lor asupra structurii dublului strat lipidic al membranei şi, implicit, asupra receptorilor de membrană. De asemenea, activează sinteza unor mediatori solubili din grupa limfokinelor sau monokinelor, a imunoglobulinelor etc. În linii mari, imunomodulatorii acţionează asupra macrofagelor, limfocitelor *T* sau *B*, celulelor *NK* etc. aflate în hipofuncţie sau în hiperfuncţie (tabelul 133).

*Tabelul 133*

**Direcţii de acţiune ale diverşilor imunomodulatori (după M.A. Chirigos şi J.E. Talmadge)**

| Celule sau funcţii stimulate | Imunomodulatorii care stimulează |
|---|---|
| Macrofage | BCG, *C. parvum*, LPS, Lentinan, Glucan Picibanil, MDP, Bestatin, IFN, Poli I:C, Tiloron, MVE, Tuftsin, MIF, MAF, Cantastim |
| Limfocitele *T* ajutătoare | IFN, IL-2, MVE-2, Poli I:C, Azimexona, Tiloron, BCG, Picibanil, Lentinan, *C. parvum*, Cantastim |
| Limfocite T supresoare | Timozina (fracţiunea 5), IL-2, Timozina-1, Picibanil, *C. parvum* |
| Limfocitele *B* | BCG, *C. parvum*, Lentinan, Cimetidina, Azimexona, Izoprinozina, Tuftsina, LPS, IFN |
| Diferenţierea celulelor *T* din precursori | Timozina fracţiunea 5, Timozina 1, Izoprinozina, Levamisol, DTC |
| Limfocitele *T* activate | Levamisol, Tiobentazol, IL-1, BCG, Tiazolobenzimidazol, Azimexona, Izoprinozina, Glucan, Lentinan, Picibanil, Imidazol, Cimetidina, Timozina 1 |
| Celulele *NK* | SpA, Picibanil, Cantastim |

DTC=dietil-ditiocarbamat; IFN=interferon; IL=interleukine; MAF=factorul de activare a macrofagelor; MIF=factorul de inhibiţie a macrofagelor; MVE-2=un copolimer divinil ester-anhidridă maleică; SpA=proteina A stafilococică.

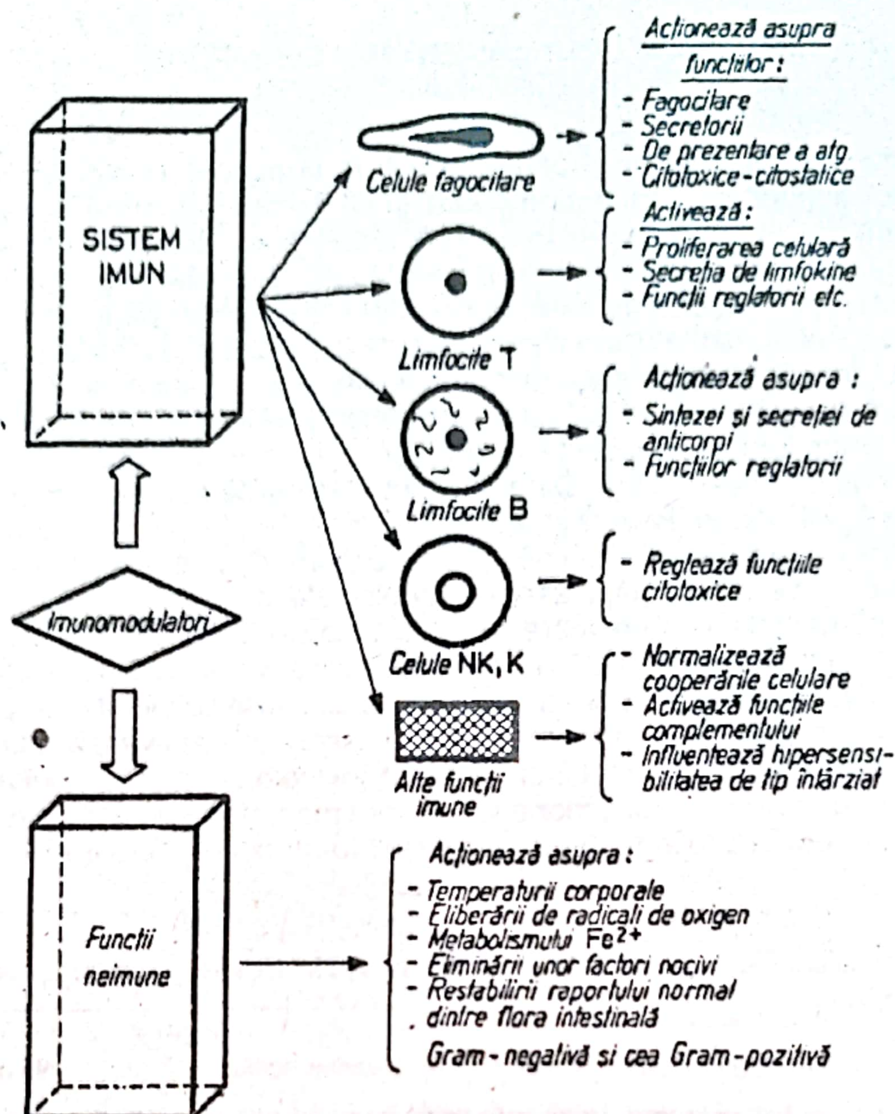



Fig.214. Diferite modalităţi de acţiune a imunomodulatorilor.

### Acţiunea asupra macrofagelor

Macrofagele prelevate de la animalele tratate cu *BCG*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Toxoplasma gondii* etc. au o capacitate sporită de inhibare nespecifică a microorganismelor. Sub influenţa lor, este stimulată creşterea conţinutului de hidrolaze lizozomale, sunt activate fagocitoza, pinocitoza, funcţiile citostatice şi citotoxice, exprimarea moleculelor MHC etc. Activarea lor funcţională se reflectă şi la nivelul receptorilor *Fc*, monocitele putând efectua mult mai intens citotoxicitatea ADCC.

Optimizarea recunoaşterii, fagocitării, prelucrării şi prezentării antigenului într-o formă mai imunogenă facilitează declanşarea reacţiilor imune mediate celular sau umoral, care vor contribui la refacerea şi menţinerea homeostaziei. Un efect major al imunomodulatorilor este activarea funcţiilor secretorii ale macrofagelor. De exemplu, inocularea intraperitoneală a BCG urmată la două săptămâni de inocularea intravenoasă de LPS provoacă sinteza activă şi eliberarea masivă în circulaţie a TNF, o citokină care poate necroza ţesutul neoplazic dar nu şi ţesutul normal, cu important rol în protecţia antitumorală. În afară de TNF, macrofagele activate de către modulatori mai produc activ IL-1, CSF etc.

## Acţiunea asupra limfocitelor T şi B

Mulţi imunomodulatori au efecte mitogene asupra limfocitelor *T* sau *B* cultivate *in vitro*. Dar, mitogenitatea nu corelează întotdeauna cu producţia de mediatori solubili secretaţi de către limfocite sau cu creşterea numărului de celule efectoare cu funcţie citotoxică. Unii dintre ei pot fi mitogeni *in vitro* pentru limfocitele unei specii şi slab mitogeni sau chiar nemitogeni pentru limfocitele altei specii. De exemplu, Cantastim este mitogen pentru limfocitele de cobai şi şoarece stimulate *in vitro* dar nu şi pentru limfocitele de om (tabelul 134).

*Tabelul 134*

**Efectul Cantastimului asupra limfocitelor de cobai şi de om cultivate in vitro (valori medii ± deviaţia standard a mediei pentru trei experimente diferite)**

| Limfocite de | Culori martor | | Culturi stimulate cu |
|---|---|---|---|
| | Nestimulate | Stimulate cu 10 $\mu$g LPS | 10 $\mu$g Cantastim |
| Cobai | 495 ± 316 | 917 æ 250 | 862 æ 320 |
| Om | 309 ± 80 | 304 æ 56 | 160 æ 45 |

Cu toate acestea, încorporarea de timidină tritiată ($^3$H-Td) în ADN-ul limfocitelor umane sau al unor specii de animale de laborator poate constitui un mijloc simplu, obiectiv şi relativ comod de testare comparativă a unor substanţe pentru evidenţierea unor posibile proprietăţi adjuvante sau imunomodulatoare ale lor. Activarea policlonală a limfocitelor poate produce uneori creşterea numărului de celule *Tc*, a numărului de limfocite *B* secretoare de imunoglobuline etc. Se pare însă că aceste activări nu se fac direct, prin relaţia imunomodulator-limfocit, ci via macrofag, care prin atributele sale funcţionale va antrena policlonal întreaga populaţie

*Tabelul 135*

**Dinamica valorilor unor constante şi funcţii ale imunităţii mediate celular, în relaţie cu unele date clinice, la o pacientă cu LI CT, la diferite momente după administrarea de Cantastim**

| Examen clinic, funcţii imune | Momentul investigării | | |
|---|---|---|---|
| | I | II | III |
| Greutatea corporală (kg) | 50 | 52 | 58 |
| Prezenţa leziunilor cutanate * | +++ | + | |
| Nr. limfocitelor/ml sânge ** | 21,5 x $10^6$ | 4,8 x $10^6$ | 4,4 x $10^6$ |
| Activitatea *NK* (% elib. specif. $^{51}$Cr) | 4,87 | 7,32 | 17,91 |
| Activitatea ADCC (% elib. spec. $^{51}$Cr) | 35,14 | 51,81 | 59,61 |
| Rozete E totale (% limf. *T*) | 54,00 | 65,00 | 62,00 |
| Rozete $E_{45}$ (T supresor) | 20,35 | 17,17 | 7,80 |

*Pacienta prezenta numeroase infecţii şi acumulări serosangvinolente subcutanate.
**După separarea prin centrifugare în gradient de densitate Ficollpaque.
Determinările efectuate în momentul I=înainte de tratament; II=după prima serie de inoculări; III=după a doua serie de inoculări de Cantastim.

limfoidă. În general este acreditată ideea că imunomodulatorii naturali sau sintetici readuc la normal funcţiile limfocitelor, monocitelor sau granulocitelor PMN. Ei ar fi eficienţi numai în cazurile în care dereglarea imună este asociată cu prezenţa în circulaţie sau la nivelul organelor limfoide secundare a unui număr normal sau chiar crescut de limfocite imature funcţional. Noi am constatat asemenea efecte folosind imunomodularea cu Cantastim în diferite boli neoplazice, inclusiv leucemiile. Tabelul 135 exemplifică rezultatele obţinute într-un caz de leucemie limfatică cronică T (LLCT).

În absenţa macrofagelor sau a celulelor limfoide, sau în cazul unor alterări profunde, ireversibile, la nivelul acestor populaţii celulare, imunostimularea nespecifică devine un non-sens.

### Acţiunea asupra celulelor nativ ucigaşe (NK)

Celulele *NK*, efectoare ale citotoxicităţii nespecifice sunt activate funcţional *in vivo* de către BCG, MDP, IFN, acidul retinoic, Picibanil, Cantastim etc. Ca şi în cazul normalizării funcţionale a celorlalte tipuri de celule, funcţiile *NK* se menţin la un nivel ceva mai crescut un timp limitat, după care revin la valorile iniţiale. De exemplu, celulele *NK* recoltate de la şoarecii trataţi cu Cantastim ucid *in vitro* celulele din linia eritroleucemică $YAC_1$ mult mai intens decât cele provenite de la animalele netratate. După 5 - 10 zile de la inocularea imunomodulatorului, eliberarea specifică de $^{51}Cr$ din celulele tumorale marcate, eliberare care este expresia lizei acestora de către celulele *NK*, scade la valorile iniţiale şi uneori chiar sub aceste valori.

### Acţiunea asupra celulelor supresoare

Imunomodulatorii diminuează sau chiar anulează efectele imunosupresoare ale unor agenţi de genul metilcolantrenului, cytarabinei, ciclofosfamidei etc. Este posibil ca această anulare să fie realizată prin acţiunea directă asupra limfocitelor *T* sau asupra macrofagelor.

Dar imunomodulatorii pot avea şi efecte diametral opuse. În absenţa agenţilor supresori, deci în stări de hiperfuncţii, pot ei înşişi acţiona ca stimulatori ai celulelor *Ts*, ai limfocitelor *B* supresoare sau macrofagelor supresoare. De exemplu, la şoarecii trataţi cu BCG, proliferează celulele care suprimă răspunsul limfocitelor *T* stimulate *in vitro* cu PHA sau ConA, inhibă funcţia limfocitelor *Th* şi *Tc*. Aceste celule sunt aderente la sticlă şi au funcţii fagocitare, ceea ce sugerează natura lor macrofagică.

În afară de macrofage supresoare, tratamentul *in vivo* cu BCG, *C. parvum*, Levamisol etc. activează şi proliferarea limfocitelor *Ts*. Aceste date sugerează că efectul modulator este rezultatul antrenării *in vivo* a diverşi factori, uneori cu funcţii opuse, care concură la menţinerea echilibrului, atât de labil, existent între activarea şi supresia răspunsului imun şi care în esenţă, în condiţii normale, nu reprezintă altceva decât diferite aspecte ale funcţiilor de imunoreglare.

Poate că datorită acestor motive se impune multă prudenţă în aprecierea efectelor stimulatorii ale unor produse biologice, mai ales atunci când se recurge la teste experimentale simple, ca de pildă evaluarea indicelui splenic.

### Alte mecanisme posibile de acţiune

O manieră de amplificare a funcţiilor de apărare imună realizată de către imunomodulatori este stimularea sintezei unor citokine de către alte citokine sau, altfel spus, activarea reţelei efectorilor moleculari. Mulţi dintre ei influenţează sinteza şi secreţia de citokine sau exprimarea receptorilor pentru aceste citokine.

Dar, pentru înţelegerea modului de acţiune a lor, trebuie cunoscute bine proprietăţile lor biologice şi funcţionale care să permită instituirea unei administrări raţionale. În caz contrar, rezultatele pot fi descurajante. De exemplu, o doză prea mare dintr-un produs cu calităţi certe imunomodulatoare poate fi imunodepresoare sau chiar nocivă, cum este cazul IFN$\gamma$ care, incorect administrat, poate accelera dezvoltarea nefritei lupice.

Unii imunomodulatori, cum ar fi unele preparate polimicrobiene sau Cantastim, provoacă la unii pacienţi imediat după inoculare o creştere pasageră a temperaturii corporale, care poate stânjeni pentru un timp proliferarea celulelor neoplazice sau multiplicarea virală. Uneori, această stânjenire pasageră este suficientă pentru a permite mijloacelor imune de apărare lichidarea agresorului aflat în dificultate.

Limfocitele, macrofagele, polimorfonuclearele sunt antrenate în detectarea prezenţei $Fe^{2+}$, fie direct, fie prin intermediul unor proteine de tipul "lactoferinei" sau "transferinei", contribuind la stocarea şi reciclarea acestuia în organism. Or, atât bacteriile cât şi celulele canceroase necesită cantităţi sporite de $Fe^{2+}$ pentru sinteza acizilor lor nucleici. De aceea, imunomodulatorii, stimulând proliferarea policlonală a limfocitelor şi activarea macrofagelor, vor contribui la o mai bună utilizare a $Fe^{2+}$. O parte din acesta va fi stocat în macrofage şi în celulele dendritice din splină, afectând – prin scăderea concentraţiei sale – condiţiile necesare multiplicării bacteriilor sau celulelor canceroase. Poate că acesta este unul dintre mecanismele de acţiune a unor oxidanţi ca vitamina A care, pe lângă activarea funcţiilor *NK*, reglează şi nivelul $Fe^{2+}$ liber din organism.

Proteina A stafilococică, datorită proprietăţii sale de a se lega la fragmentul *Fc* al imunoglobulinelor, poate fixa complexele imune circulante, îndepărtând o parte dintre factorii blocanţi existenţi în serul purtătorilor de tumori. Desigur că, în caz de deficit de sinteză, administrarea de interleukine, de factori de creştere, de hormoni timici normalizează rapid funcţiile celulare care sunt condiţionate de prezenţa acestora.

Scăderea factorilor blocanţi, activarea complementului, creşterea numărului de celule formatoare de rozete, normalizarea proporţiei de limfocite *Ts* (*CD* $8^{+}$), activarea funcţiilor *NK* şi *Tc*, intensificarea reacţiior de hipersensibilitate etc. sunt tot atâtea mijloace nespecifice de activare sau de normalizare a reacţiilor de apărare imună, realizate de către imunomodulatori, finalizate prin creşterea rezistenţei organismului la agresiunea tumorală (fig. 215).

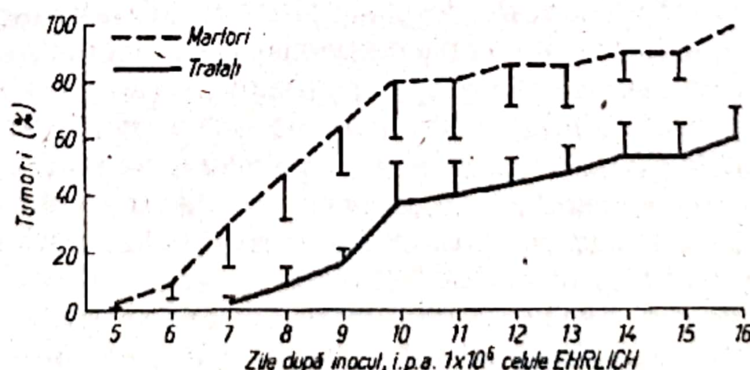



Fig.215. Dinamica apariţiei tumorii ascitogene la şoarecii $A_2G$ inoculaţi i.p. cu 1 $10^{6}$ celule Ehrlich, pretrataţi cu Cantastim (linia continuă) şi la martorii care nu au primit terapia imunomodulatoare (linia întreruptă). La 16 zile de la inoculul celulelor tumorale, toţi şoarecii din loturile martor au dezvoltat tumora ascitogenă (100%), pe când cei supuşi terapiei imunomodulatoare au avut ascită în proporţie de 50%. Datele reprezintă valorile medii $\pm$ DS ale procentelor de animale cu tumoră la diferite zile de la inoculul celulelor Ehrlich. Au fost efectuate 3 experimente diferite (câte 40 de şoareci pentru fiecare experiment).

Indiferent de originea şi de modul lor de acţiune, imunomodulatorii ridică unele probleme legate de gradul lor de puritate şi de posibile efecte nocive pe care le-ar putea avea, în cazul în care ar conţine şi molecule cu efecte vătămătoare. În afară de aceasta, în special în cazul imunomodulatorilor de origine animală, se ridică problema oportunităţii sau inoportunităţii administrării lor. De pildă, unele peptide timice cum ar fi timopoietina, "factorul umoral timic "(THF) etc., sau unele citokine ca interferonii, IL-1, IL-2, G-CSF şi alţii sunt administraţi în scop terapeutic la pacienţii cu boli neoplazice. În unele cazuri, rezultatele sunt pozitive, pe când în altele sunt incerte sau total negative. Dar, aceste preparate biologice, spre deosebire de cele de origine bacteriană sau vegetală, sunt produse de către organismul uman. Pare deci logică ideea ca, înainte de administrare, să fie determinate calitativ şi cantitativ prezenţa lor în umorile şi ţesuturile pacientului precum şi modul de exprimare a receptorilor pentru ele la nivelul diferitelor celule. Dacă sinteza lor este nealterată şi dacă celulele exprimă receptori pentru ele, atunci ce rost mai are administrarea de astfel de citokine? În cazul interferonilor, în loc de administrarea lor pasivă, de-a gata, nu este mai judicios şi mai benefic pentru pacient să i se administreze inductori de interferoni? De altfel, în unele boli este mai indicată administrarea de inhibitori ai unor citokine decât inocularea acestora. Este cazul stărilor alergice, unde inhibitorii de IL-4 sunt mai eficienţi decât administrarea de interferoni.

## ASEMĂNĂRI ŞI DEOSEBIRI ÎNTRE SUBSTANŢELE IMUNOMODULATOARE ŞI CELE ADJUVANTE

Deoarece multe preparate modulează dar şi stimulează reacţiile imune, o delimitare absolut categorică între aceste două categorii este greu de făcut, multe dintre ele acţionând atât ca imunomodulatori cât şi ca adjuvanţi. De pildă, endotoxinele şi LPS acţionează ca modulatori ai răspunsului imun dar şi ca adjuvanţi, în timp ce saponina sau hidroxidul de aluminiu sunt folosite numai ca adjuvanţi.

Între aceste două grupe de substanţe ar fi unele deosebiri esenţiale, şi anume:

*a.* Preparatele imunomodulatoare readuc în limite normale funcţiile imune, activându-le atunci când sunt depresate sau inhibându-le atunci când sunt exagerat de active. Adjuvanţii au numai proprietăţi stimulatoare.

*b.* Imunomodulatorii sunt administraţi în afara stimulului antigenic şi acţionează independent de acesta. Adjuvanţii sunt inoculaţi obligatoriu împreună cu antigenul. Ei sunt substanţe cu structuri moleculare diferite care măresc imunogenitatea antigenului atunci când sunt inoculaţi împreună cu acesta, motiv pentru care multe vaccinuri au asociate substanţe adjuvante. Activitatea lor depinde de capacitatea de activare a limfocitelor *T* şi bineînţeles şi a macrofagelor. Dintre adjuvanţi, bine cunoscuţi sunt adjuvantul *Freund* complet sau incomplet, gelul de hidroxid de aluminiu, saponina, silicatul de aluminiu, gelul de poliacrilamidă, celuloza, endotoxina germenilor Gram-negativi (care de fapt este un complex lipoproteic asemănător ca efect cu ceara D a bacilului Koch), vitamina A etc.

Calităţi de adjuvant au şi grupările purtătoare ("carrier") ale antigenelor, deoarece numai în prezenţa lor haptenele pot deveni imunogene. Chiar şi anticorpii au astfel de calităţi: un preparat antigenic devine mai imunogen atunci când este inoculat sub fomă de complex antigen-anticorp în uşor exces de antigen, decât atunci când antigenul este inoculat singur sau în cadrul unui complex cu

exces de anticorpi. Complexat cu anticorpii, antigenul devine mai accesibil macrofagelor care-l fagocitează mai uşor (fagocitoză opsonică) şi-l degradează mai eficient în fagolizozom..

Din punct de vedere practic, se cunosc patru grupe de adjuvanţi:

1. *Saponinele* de origine vegetală care stimulează sinteza anticorpilor, activează limfocitele *Tc*, reacţiile de hipersensibilitate de tip întârziat, sinteza de interferoni şi exprimarea moleculelor MHC de clasa II pe suprafaţa macrofagelor, limfocitelor *T* ajutătoare, limfocitele *B* etc.

2. *Polimerii neionici,* alcătuiţi din *polioxipropilene hidrofobe* şi *polioxietilene hidrofile,* cu efecte stimulatoare asupra răspunsului imun umoral.

3. *Monofosforil-lipid A,* un derivat al LPS cu acţiune asupra limfocitelor $Th_1$. Este un potent activator al sintezei de IFN.

4. *Citokinele,* ca de pildă IFN$\gamma$ care stimulează limfocitele $Th_1$, activează eliberarea de IL-1 şi exprimarea de molecule MHC de clasa II de către macrofage. Interferonul gamma a dat bune rezultate când a fost asociat cu vaccinul anti-hepatita B (Hbs) sau cu sporozoizii de *Plasmodium falciparum* în vederea inducerii imunităţii faţă de hepatita virală sau malarie.

Mai sunt utilizate IL-2, G-CSF, GM-CSF etc.

Adjuvantul Freund, care stimulează limfocitele $Th_1$, nu este acceptat pentru administrare în clinică deoarece există riscul de inducere a reacţiilor autoimune, risc care de altfel există şi la alte preparate de acest gen. Sunt acceptate preparatele de aluminiu care stimulează limfocitele $Th_1$ şi răspunsul imun umoral. Aceste preparate dau bune rezultate atunci când sunt asociate cu vaccinul anti-malarie.

Deci, compoziţia chimică a moleculei sau modul de asociere a acesteia cu alte molecule condiţionează calitatea de adjuvant al unei substanţe. De exemplu, adjuvantul Freund incomplet este alcătuit din ulei de parafină în care a fost introdus un emulgator (lanolina) care avea atât grupări hidrofile cât şi grupări lipofile. Adjuvantul Freund complet conţine în plus şi mycobacterii omorâte, al căror principiu activ este ceara D, un complex glucido-lipido-polipeptidic responsabil de efectul de adjuvanţiere. Componenta lipidică conţine acizi graşi ramificaţi de genul "acidului micolic", cea glucidică conţine galactoză, arabinoză, manoză etc., iar cea peptidică, aminoacizi ca D-Ala, D-Glu, acidul diaminopimelic etc. Modul de acţiune al adjuvanţilor este complex dar, în linii mari, se poate afirma că ei pot stimula selectiv celulele prezentatoare de antigen şi limfocitele *T* sau *B*.

Practic, ei realizează următoarele:

*a.* Prelungesc prezenţa antigenului în organism sub formă de depozit, de unde acesta este eliberat treptat. De exemplu, adjuvantul Freund incomplet întârzie degradarea locală şi eliberarea antigenului, acesta fiind găsit la locul de inoculare chiar şi după şase luni de la introducerea sa în organism.

*b.* Permite dispersarea antigenului pe cale limfatică şi facilitează accesul acestuia în ganglionii limfatici.

*c.* Unii adjuvanţi, cum ar fi adjuvantul Freund complet, determină instalarea hipersensibilităţii de tip întârziat, activând funcţiile limfocitelor *Td*.

*d.* Pot stimula diviziunea limfocitelor, activând proliferarea clonală sau policlonală a acestora. Au, deci, efect mitogen.

*e.* Activează funcţiile lizozomale ale macrofagelor, făcându-le să funcţioneze mai eficient. În acest fel, substanţele pe care enzimele lizozomale le degradează mai greu devin mai vulnerabile şi ca atare mai imunogene.

Bineînţeles că, în afară de cele menţionate mai sus, mai există şi alte mecanisme prin care se realizează proprietăţile de adjuvant ale diferitelor substanţe.

Dar, după cum a rezultat din cele expuse, modul şi mecanismele de acţiune ale imunomodulatorilor diferă fundamental de cele ale adjuvanţilor, deşi uneori ele par a avea efecte asemănătoare.

*De la speranţe la realitate*. În esenţă, imunomodularea nu reprezintă altceva decât o activare a întregului ansamblu de mijloace imune ale organismului. Dar această activare reprezintă doar o "alarmă generală", care pune în stare de veghe absolut toate tipurile de "arme de luptă".

Descoperirea imunostimulatorilor nespecifici a generat speranţe şi entuziasm. Se spera că, în sfârşit, au fost găsite mijloacele terapeutice care vor vindeca "miraculos" multe dintre bolile cronice şi în special pe cele neoplazice. Din păcate, entuziasmul iniţial a ajuns la cote ceva mai scăzute, succesele terapeutice nefiind pe măsura speranţelor. S-a constatat că nu se obţin în mod constant rezultate pozitive, fluctuaţiile fiind generate de căre o serie de factori ca: stadiul bolii în momentul începerii tratamentului, competenţa imună a pacienţilor, tulpina de germeni, doza, calea de inoculare, frecvenţa şi durata inoculărilor, momentul începerii tratamentului raportat la momentul intervenţiei chirurgicale, iradierii sau chimioterapiei (în cazul tumorii) etc.

În multe cazuri, au fost obţinute efecte contrare celor scontate, fapt care a făcut pe unii să afirme că terapia nespecifică este un risc şi nu o binefacere. Dintre riscurile potenţiale ale acestei terapii, atunci când se administrează incorect de către persoane ignorante şi incompetente, pot fi amintite:

*a)* sensibilizarea organismului la imunostimulent (atunci când acesta este imunogen sau alergizant);

*b)* dezvoltarea de reacţii autoimune;

*c)* creşterea nivelului seric al anticorpilor blocanţi;

*d)* creşterea numărului de celule supresoare sau activarea lor funcţională;

*e)* pot fi toxice pentru celulele limfoide sau mieloide;

*f)* pot provoca apariţia leucemiilor limfoide sau mieloide.

Pentru evitarea acestor situaţii şi pentru obţinerea rezultatelor care pot fi benefice şi nu dăunătoare, se impune cercetarea fundamentală a modului de identificare a modulatorilor, a modului lor de acţiune precum şi a modului lor de administrare. În cazul bolii canceroase, se impune asocierea judicioasă a terapiei imunomodulatoare nespecifice, cu terapia specifică antineoplazică, deoarece numai distrugând tumora şi stimulând sistemul imun se pot obţine rezultate evidente. În orice caz, modularea nespecifică a răspunsului imun rămâne o problemă deschisă, plină de necunoscut, dar şi de atracţii, atât pentru cercetător cât şi pentru clinician.

# MIJLOACE DE APĂRARE IMUNĂ LA NIVELUL CAVITĂŢII BUCALE

Cavitatea bucală, datorită rolului ei fiziologic, este o parte a organismului foarte expusă contactului permanent cu flora microbiană şi virală existentă în alimente şi apă.

Pentru a neutraliza posibilitatea de penetrare a agenţilor străini în intimitatea ţesuturilor şi alterarea funcţională a lor, la nivelul acestei cavităţi există un arsenal de mijloace de apărare nespecifică şi specifică alcătuit din bariere mecanice, diverse secreţii şi, bineînţeles, din numeroase celule care formează un adevărat *ţesut limfoepitelial asociat mucoasei.* Stratul epitelial al mucoasei bucale formează, atât timp cât este intact, o barieră de nepătruns pentru germenii patogeni din exterior. El este în permanenţă umectat de către produsele de secreţie ale glandelor salivare care, pe de o parte elimină mecanic corpii bacterieni depuşi pe suprafaţa mucoaselor, iar pe de altă parte îi distrug prin substanţele bactericide pe care le conţin.

În afară de protecţia strict mecanică realizată de către mucoase, există şi alte mijloace nespecifice, dar şi specifice, de apărare la nivel oral, dintre care mai importante sunt:

*a.* Mijloace nespecifice: saliva şi componentele ei, *p*H-ul secreţiilor, fagocitoza neimună.

*b.* Mijloace specifice: imunitatea umorală mediată de către anticorpi şi imunitatea celulară mediată de către limfocite *Tc* şi alte populaţii celulare.

## MIJLOACE NESPECIFICE DE APĂRARE

*a. Saliva.* Este un lichid incolor şi vâscos, produs al secreţiilor glandelor submaxilare, sublinguale şi al parotidelor. Conţine cca 97 - 98% apă, 1 - 2% săruri de Ca, Na, Mg şi în special K, şi cca 1% mucine, globuline etc. De asemenea, conţine unele enzime cum ar fi *amilaza,* care hidrolilează amidonul în dextrină şi maltoză, *maltaza* care continuă hidroliza amidonului etc. Are un *p*H uşor alcalin (7, 4 - 8,0) cu rol de tampon, graţie bicarbonaţilor şi fosfaţilor din compoziţia sa.

Enzimele, *p*H-ul, eliminarea mecanică a bacteriilor ca urmare a fluxului secretoriu continuu (800 - 1 000 ml/zi) fac ca saliva să fie un puternic factor de menţinere a condiţiilor normale la nivelul cavităţii bucale. La aceasta contribuie şi prezenţa din abundenţă a *lizozimului,* o proteină bazică descoperită de către Al. FLEMING în 1922, care acţionează ca enzimă mucolitică desfăcând legăturile dintre *N-acetil-glucozamină* şi *acidul N-acetilmuramic* din complexele mucopeptide existente la nivelul peretelui bacterian. Lizozimul se găseşte din abundenţă şi în granulele celulelor fagocitare, în secreţiile nazale, conjunctivale etc., poate

liza bacteriile sau le poate ucide prin mecanisme non-litice, cooperând în acest sens cu moleculele de anticorpi, în special cu cei IgA-secretor.

b. *Fagocitoza imună,* efectuată de către granulocitele PMN şi intervenţia proceselor inflamatorii, limitează şi diminuează până la anulare posibilităţile instalării unor procese infecţioase la acest nivel. De exemplu, în cazul apariţiei unor porţi deschise datorită unor leziuni ale epiteliului sau smalţului dentar, germenii pot pătrunde în intimitatea ţesuturilor. Multiplicarea lor este însă limitată, deoarece intervin procese inflamatorii care formează o adevărată barieră, un perete despărţitor care izolează focarul infecţios şi protejează ţesutul normal din vecinătate. Au loc un masiv aflux de granulocite, şi o intensă eliberare de factori chemotactici şi de mediatori ai inflamaţiei care afectează chemotactismul şi fagocitoza, stimulând distrugerea agresorilor şi anihilarea infecţiei. Organele limfoide secundare asociate tubului digestiv, şi anume amigdalele, ganglionii retrofaringieni, ganglionii parotidieni, sublinguali etc., formează un inel de apărare la nivelul căruia au loc atât distrugerea nespecifică a germenilor, prin fagocitoză şi procese inflamatorii, cât şi cooperări celulare generatoare de răspuns imun specific.

Inflamaţiile amigdalelor, ale formaţiunilor limfoide perifaringiene sunt procese frecvent întâlnite în clinică. Ele sunt manifestările răspunsului la agresiuni bacteriene, amigdalectomia practicată adeseori ţintind îndepărtarea unui "focar infecţios".

Dar oare, o dată cu "focarul", nu se elimină şi nişte mijloace de apărare potente ale organismului?

## MIJLOACE SPECIFICE DE APĂRARE

### APĂRAREA CAVITĂŢII BUCALE PRIN MIJLOACE IMUNE MEDIATE UMORAL

Este realizată practic de către toate clasele de imunoglobuline, rolul major revenind însă clasei IgA. Din totalul limfocitelor *B* şi al plasmocitelor secretoare de anticorpi existent la nivelul cavităţii bucale şi al organelor limfoide secundare care protejează această cavitate, 6 - 8% produc anticorpi din clasa IgM, 4 - 5% din clasa IgG şi 2-4% din clasa IgD. Restul de cca 80 - 90% sunt celule secretoare de IgA, sinteza anticorpilor IgE fiind inexistentă în această regiune a organismului. În cazul unui deficit de sinteză de IgA, în populaţia de plasmocite salivare se constată o sporire a numărului de celule producătoare de IgD, situaţie întâlnită şi în cazul secreţiilor lacrimale şi nazale, dar nu şi la nivelul intestinului.

Plasmocitele secretoare de IgA se găsesc dispersate în toată cavitatea bucală, cu precădere printre acinii salivari şi ciorchinii glandulari asociaţi ducţilor excretori ai glandelor salivare. Aceştia produc peste 95% din totalul de imunoglobuline existent în salivă. Cu alte cuvinte, în salivă sunt cca. 95% molecule de IgA secretor, restul fiind molecule de IgA seric (5%). De regulă, aceste molecule de anticorpi sunt dimeri IgA care au lanţul *J* şi componenta secretorie sintetizate în apropierea glandelor salivare. Plasmocitele aflate la nivelul unei astfel de glande produc cca. 0,04 grame de molecule/zi, iar cele aflate la nivelul glandelor submandibulare, cca. 0,08 g/zi. Existenţa acestor cantităţi masive de molecule de IgA secretor la nivelul glandelor salivare permite ideea că aceste glande pot constitui structuri imunologice cu rol important în apărarea antibacteriană şi antivirală de la nivelul cavităţii bucale. Dintre celulele producătoare de IgA, 36 - 38% sintetizează anticorpi din subclasa $IgA_2$ iar 62 - 64%, anticorpi din subclasa $IgA_1$ dimer.

În comparaţie cu alte specii de mamifere, la om, ţesutul limfoepitelial asociat mucoasei este mai sărac în celule limfoide. Aceasta ar putea explica în parte rezultatele mediocre obţinute atunci când se practică aplicarea locală, pe mucoasă, a vaccinului.

Se pare că o parte dintre limfocitele secretoare de astfel de anticorpi din cavitatea bucală sunt stimulate de către antigene la nivelul amigdalelor. Aceste organe limfoide se deosebesc de alte structuri limfoepiteliale prin numeroasele lor cripte, la nivelul cărora se poate acumula material antigenic în cantităţi suficiente realizării stimulului necesar. Aici s-ar face cooperarea celulelor APC cu limfocitele *Th* şi cu cele *B*, cooperare finalizată prin apariţia plasmocitelor secretoare sau, după caz, prin activarea proliferării clonale a limfocitelor *T* citotoxice. Aşa s-ar explica descreşterea masivă a anticorpilor IgA salivari după amigdalectomie sau după infecţii care alterează profund structura amigdalelor, cum ar fi mononucleoza infecţioasă. În astfel de situaţii, are loc o creştere locală compensatorie a nivelului IgD, probabil ca o consecinţă a stimulării limfocitelor B de către unele microorganisme care au putut prolifera nestânjenit în absenţa anticorpilor IgA secretorii, anticorpi nocivi pentru astfel de specii.

În realitate, există o reţea unică, un fel de *sistem imunologic comun al mucoaselor,* responsabil de sinteza imunoglobulinelor secretorii, compus din celulele şi formaţiile limfoide de la nivelul epiteliului intestinal, pulmonar, salivar şi conjunctival. Limfocitele *B* de memorie pot recepţiona semnalele antigenice la nivelul plăcilor Peyer, amigdalelor şi chiar al ganglionilor limfatici, după care unele dintre ele pot migra pe cale limfactică sau sangvină spre diverse locuri, cum ar fi splina, ganglionii limfatici, glandele salivare, mucoasele alveolelor respiratorii etc. unde se diferenţiază în plasmocite producătoare de IgA secretor (fig. 216).

Se ştie că migrarea unor celule spre diferite locuri ar fi controlată de receptori pentru "homing" (ecotaxie) care recunosc specific determinanţii antigenici exis-

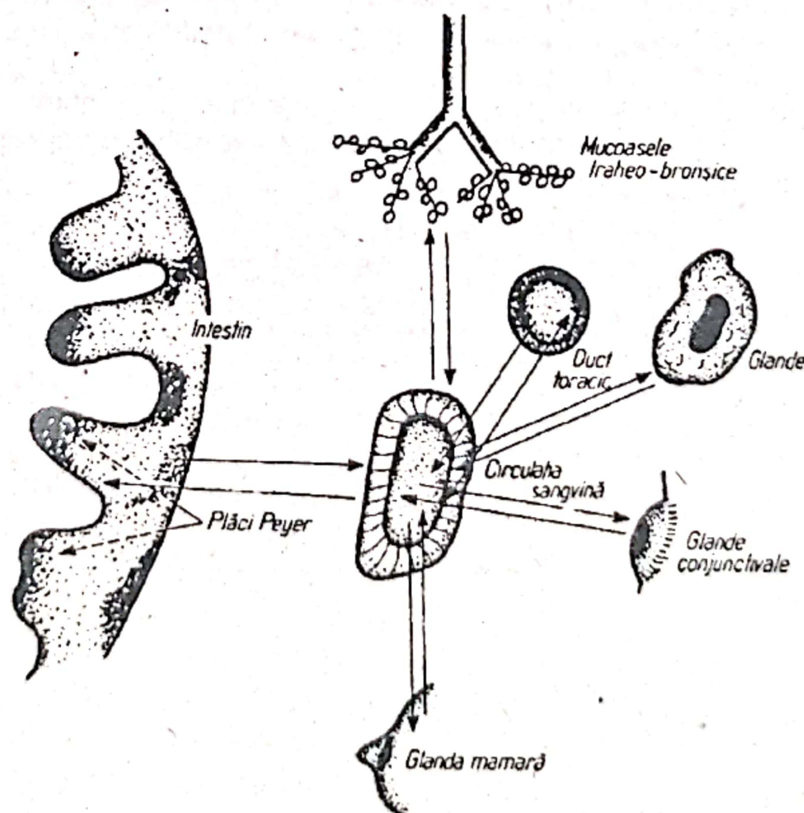



Fig.216. Ţesut limfoepitelial asociat mucoaselor (adaptare după P. Brandtzaeg).

tenţi la nivelul organelor limfoide, celulelor endoteliale ale tractusului respirator, glandelor salivare etc. Anticorpii aparţinând clasei IgA secretor, datorită structurii lor moleculare - dimeri legaţi prin lanţul *J* la penultimul reziduu de Cys - şi în special datorită încorporării componentei secretorii, au o remarcabilă stabilitate, acţionând ca o "primă linie de apărare specifică" a mucoaselor. Ei pot fixa antigenele solubile sau particulate, adică molecule sau celule bacteriene care, în acest mod, sunt aglutinate şi eliminate rapid prin fagocitoză opsonică efectuată în special de către granulocitele PMN cu receptori de membrană pentru fragmentul *Fc* al acestor anticorpi (*Fcα*R).

Anticorpii IgA secretori sunt mult mai aglutinogeni decât cei IgA serici. Datorită acestei proprietăţi, ei întârzie colonizarea bacteriilor pe suprafeţele dure. Probabil că pentru acest motiv IgA salivară se află încorporată în placa dentară şi în pelicula de suprafaţă unde, după cum arătam, interferă cu aderarea bacteriilor la smalţ. Într-adevăr, un nivel scăzut al secreţiei de către parotidă a anticorpilor IgA este însoţit de o colonizare masivă a bacteriilor *Streptococcus mutans* pe suprafeţele molarului. Aceşti anticorpi nu activează complementul, dar pot neutraliza diferite specii virale, bacteriene, fungice şi pot realiza procese de citotoxicitate mediată celular, anticorp-dependentă (ADCC). În ciuda remarcabilei lor rezistenţe la acţiunea distructivă a enzimelor, există totuşi unele specii bacteriene care produc proteaze distructive. Este cazul germenilor *Streptococcus sanguis, S. mitior, Capnocytophaga* şi altele, implicate în boala periodontală. În cazul în care sunt sintetizate molecule de anticorpi IgA secretorii cu specificitate faţă de enzimele acestor germeni, situaţie existentă la unii indivizi şi absentă la alţii, atunci efectul distructiv periodontal al germenilor amintiţi anterior este mult limitat sau chiar anulat. Este remarcabilă variabilitatea de reacţie imună specifică a indivizilor faţă de flora existentă în cavitatea bucală şi faţă de enzimele proteolitice ale acestei flore. Poate aşa s-ar explica şi variabilitatea individuală înregistrată în patologia stomatologică: subiecţi cu dinţi perfect normali până la adânci bătrâneţe şi subiecţi cu carii dentare sau periodontite grave, manifestate clinic de la vârste foarte tinere.

În afară de anticorpii din clasa IgA, există şi mici cantităţi de anticorpi din clasele IgM, IgD şi IgG, concentraţia acestora în diferite secreţii fiind foarte diferită (tabelul 136).

*Tabelul 136*

**Concentraţia anticorpilor din clasele IgG, IgA şi IgM existentă în diferite secreţii (mg/ml)**

| Secreţia | Anticorpi din clasa | | |
|---|---|---|---|
| | IgG | IgA | IgM |
| Plasmă | 12,00 | 4,00 | 1,00 |
| Colostru | 0,20 | 12,00 | 0,60 |
| Salivă | 0,10 | 0,30 | 0,00 |
| Secreţii nazale | 0,15 | 1,50 | 0,00 |
| Secreţii duodenale | 0,10 | 0,40 | 0,20 |
| Secreţii jejunale | 0,40 | 0,30 | ? |

În cavitatea bucală, contribuţia glandelor la aportul de imunoglobuline diferă nu numai de la o glandă la alta, dar şi de la un individ la altul, de la starea de sănătate la cea de boală etc. (tabelul 137).

*Tabelul 137*

**Nivelul imunoglobulinelor din salivă la subiecţii normali şi la pacienţii cu parodontoză (mg/litru; valori medii +DS)**

| Starea dinţilor | Imunoglobuline | | |
|---|---|---|---|
| | IgG | IgA | IgM |
| Sănătoşi | 14,4 + 9,0 | 194,0 + 53,7 | 2,1 + 1,9 |
| Parodontoză | 69,7 + 33,6 | 371,4 + 224,7 | 7,6 + 5,4 |

În parodontoză, deci, are loc o creştere masivă a anticorpilor aparţinând tuturor celor trei clase de imunoglobuline. Această creştere ar putea fi rezultatul stimulilor antigenici de la nivelul cavităţii bucale, stimuli care activează proliferarea clonală şi cooperările celulare. Imunoglobulinele pot fi sintetizate local, cum este cazul unei proporţii semnificative de anticorpi IgA secretorii, dar pot fi sintetizate şi la nivelul întregului "sistem imunologic comun mucoaselor", sau chiar la nivelul ganglionilor limfatici.

Anticorpii din clasa IgM, mai puţin rezistenţi la degradarea proteolitică decât cei din clasa IgA secretor, activează componentele complementului, putând acţiona ca anticorpi compensatori atât la nivelul alveolelor pulmonare şi bronhiilor cât şi în cavitatea bucală a bolnavilor cu deficit de IgA. Ei sunt sintetizaţi la nivelul organelor limfoide secundare, cea mai mare parte ajungând la mucoase pe cale circulatorie sau limfatică. Relaţia directă dintre nivelul seric şi cel salivar al acestor anticorpi este o dovadă a originii serice a celor IgM din salivă. Cu cât titrul acestor anticorpi este mai mare în ser, cu atât şi cantitatea lor în salivă este mai crescută. Această relaţie nu există în cazul anticorpilor din clasa IgA.

Imunoglobulinele din clasa IgG aflate în salivă au aceleaşi proprietăţi funcţionale ca şi cele din circulaţie. Este şi normal să fie aşa, deoarece IgG ajung în cavitatea bucală traversând diferite epitelii şi în special crevasa gingivală. Tot prin difuzie pasivă ajung şi o parte din anticorpii IgD. O altă parte este sintetizată local, fapt care ar explica de ce în primele 6 luni după naştere nivelul IgD salivar este mult mai mare comparativ cu nivelul seric.

În cazul anticorpilor din clasa IgE, nu se poate vorbi de o sinteză la nivelul cavităţii bucale. Puţinele molecule care au fost decelate în salivă ajung aici printr-un transport selectiv, rostul prezenţei lor fiind necunoscut.

### Factori care influenţează nivelul imunoglobulinelor salivare

Determinarea cantitativă a imunoglobulinelor salivare este dificilă deoarece recoltarea corectă a salivei întâmpină greutăţi de ordin tehnic. Pot exista scurgeri active de anticorpi, contaminări cu secreţii lacrimale etc., care modifică datele reale. În afară de aceasta, intervin diverşi alţi factori care contribuie la variabilitatea rezultatelor. Dintre aceştia, pot fi menţionaţi:

*a. Vârsta.* În saliva nou-născutului se găsesc predominant imunoglobuline din clasa IgG de origine maternă, care persistă cca 2 luni după naştere. De

asemenea, sunt prezente piesa secretorie liberă şi cantităţi foarte mici de anticorpi din clasele IgM şi mai ales IgA secretor. Nu se ştie precis dacă aceşti anticorpi sunt de origine maternă sau sunt sintetizaţi de către fetus. În primele săptămâni de viaţă se găsesc cantităţi mari de anticorpi IgD care scad treptat, fiind substituiţi cu anticopri IgA, al căror titru creşte constant până la vârsta de doi ani.

b. *Modul de alăptare* a sugarului influenţează nivelul salivar al anticorpilor, o parte dintre aceştia fiind probabil transmişi pasiv prin colostru de către mamă.

c. *Statusul dentar* are influenţă asupra concentraţiei de IgG, dar nu şi de IgA. La persoanele edentate, nivelul IgG scade la 1/3 - 1/4 comparativ cu cel existent la normali, fără a se înregistra nici o modificare a nivelului IgA. Dar, prezenţa cariilor induce o creştere a IgG salivar, probabil ca urmare a unor stimuli suplimentari realizaţi de către flora bacteriană orală. În general, există o relaţie inversă între activitatea imună a sistemului glandular-salivar şi cariile dentare. Până în prezent, nu sunt date convingătoare şi certe care să ateste existenţa unei relaţii între nivelul salivar al imunoglobulinelor şi parodontopatii sau alte afecţiuni ale mucoaselor.

d. *Alte stări patologice*. În infecţii cronice, alergii, în unele boli autoimune, pot exista deficite de IgA salivar. De exemplu, la copii cu amigdalite grave sau cu astm bronşic, nivelul IgA salivar este scăzut. În general, imunoglobulinele salivare scad în deficite ale celulelor *B*. În spondilita anchilozantă, în dermatite herpetiforme, nivelul lor creşte, dar nu se poate stabili o relaţie strânsă între aceste variaţii şi patologia orală.

### APĂRAREA CAVITĂŢII BUCALE PRIN MIJLOACE IMUNE MEDIATE CELULAR

Existenţa la nivel oral a mecanismelor de apărare imună mediată celular, având ca efectoare limfocitele şi macrofagele, este în afară de orice discuţie. Diseminarea acestor celule în mucoasa cavităţii bucale este determinată de necesitatea intervenţiei lor directe. De exemplu, în sindromul Sjögren, apar infiltrate limfoide extinse în ţesutul parotidian şi în alte glande salivare sub formă de "insule mioepiteliale" înconjurate de acumulări masive de limfocite *T*, macrofage, granulocite PMN şi celule *B*.

Probabil că efectorii imunităţii mediate celular, cu referire specială la celulele *NK* şi limfocitele *Tc*, neutralizează celulele epiteliale, musculare etc. infectate viral sau deviate neoplazic. În cazul unor disfuncţii, al unor depresii funcţionale ale sistemului imun, pot apărea frecvent stomatite aftoase sau chiar procese tumorale care, datorită iritaţiilor permanente provocate de către flora bacteriană foarte bogată şi de către alimente, pot evolua rapid spre deznodăminte fatale. Limfocitele citotoxice şi ajutătoare ajung la acest nivel venind din circulaţia sangvină şi limfatică generală. Ele pot fi stimulate antigenic la nivelul amigdalelor de pildă, după care pot ajunge în organele limfoide, sau pot proveni de la aceste organe limfoide secundare aflate la distanţă, cantonându-se în ţesuturile orale. O dovadă a intervenţiei imunităţii mediate celular la acest nivel este rezultatul benefic obţinut prin terapia sistemică cu Cantastim şi Antiherpin a ulcerelor şi stomatitelor aftoase cu etiologie virală şi în special herpetică. Stimularea selectivă sau specifică a clonelor limfocitare şi normalizarea rapoartelor dintre diferite subclase de limfocite prin terapia sistemică readuc la normal starea de sănătate a ţesuturilor moi din cavitatea bucală. În privinţa dentiţiei, cunoştinţele referitoare la acest subiect sunt practic nule. Nu este exclus ca parodontoza cronică, de exemplu, să fie expresia, printre altele, şi a intervenţiei unor componente autoimune mediate celular, dar dovezi categorice în acest sens încă nu există.

Se pare că anticorpii IgA salivari au capacitate de recunoaştere specifică, orientată exclusiv spre antigenele florei orale. Totuşi, rolul lor şi rezultatele vaccinărilor rămân încă obscure. Este cert că imunizarea enterică este urmată de o creştere a nivelului IgA salivar. Dar şi imunizarea subcutanată experimentală cu *S. mutans* asociat cu adjuvant Freund complet a redus incidenţa cariilor dentare, probabil ca rezultat al acţiunii bactericide şi opsonizante a anticorpilor IgG derivaţi din ser. Se pare că protecţia anticarie este mediată mai mult de către anticorpi IgG faţă de *S. mutans* prin activarea complementului, şi nu de către anticorpii din clasa IgA. Deşi la om anticorpii IgA salivari pot inhiba colonizarea *S. mutans*, nu se ştie totuşi dacă pot inhiba şi dezvoltarea cariilor, apariţia acestora fiind probabil un proces mult mai complex.

Vaccinul anti-carie ar avea după unii rol protector, iar după alţii nu ar avea un astfel de rol, deoarece imunizarea pe cale orală sau parenterală faţă de *S. mutans* nu protejează întotdeauna faţă de carie. Experimental s-a dovedit că vaccinările anticarie implică stimularea sintezei de anticorpi IgG cu specificitate faţă de *S.mutans* în special, stimulare care poate genera gingivite incipiente prin complexe imune, deci reacţii de hipersensibilitate de tip III şi chiar endocardite şi nefrite autoimune. De aceea, este de dorit ca vaccinarea să ducă la stimularea anticorpilor din clasa IgA şi nu IgG.

Cu toate că sunt încă multe necunoscute, la om au început să fie folosiţi în clinică unii imunomodulatori obţinuţi prin lizate bacteriene, ca mijloace terapeutice sau de prevenire a unor procese supurative, gingivoragii de genul gingivitelor, parodontitelor, abceselor parodontale, alveolitelor supurative etc. De exemplu firma franceză LABORATOIRES DE THERAPEUTIQUE MODERNE LTM comercializează produsul IMUDON format din lizate de:

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lactobacillus lactis*
- *Lactobaciullus fermentans*
- Streptococi de grup A, H, D
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Corynebacterium pseudodiphtericum*
- *Fusiformis fusiformis*
- *Candida albicans*

} câte 0,050 g de produs uscat

- Etilmercuritiosalicilat de sodiu - 0,0125 mg
- Excipient q.s. (la un comprimat cca 0,582 g).

Produsul se administrează în doză de câte 4 - 8 comprimate, timp de 6 - 20 de zile. Se suge lent, fără a sfărâma tableta. Încorporarea în lipozomi a unor antigene bacteriene, asocierea vaccinurilor cu imunomodulatori sau adjuvanţi, determinarea exactă a căilor de administrare (orală, sistemică, enterală) a dozelor sunt direcţii de cercetare viitoare.

# RELAŢII STRUCTURALE ŞI FUNCŢIONALE NEURO - IMUNO - ENDOCRINE

## CONCEPTUL DE STRES

În anul 1936, Hans SELYE într-un articol publicat în revista *Nature* semnala faptul că toţi bolnavii, indiferent de boală, au ceva comun între ei, şi anume, o stare de epuizare fizică însoţită de febră, paloare, adinamie etc. Această caracteristică particulară, care însoţeşte alterarea stării de sănătate, a numit-o "sindromul general de adaptare" sau, "sindromul de stres" care se instalează în trei stadii succesive: *a)* un stadiu iniţial de "alarmă" la impactul organismului cu agentul stresant; *b)* stadiul de "rezistenţă", de mobilizare a forţelor de apărare şi de adaptare la noile condiţii şi c) stadiul final de epuizare, prezent atunci când agentul stresant acţionează violent şi prelungit.

Aşadar, stres-ul reprezintă reacţia organismului la stimuli fizici, chimici, biologici sau psiho-sociali, care-i perturbă echilibrul său fiziologic normal mergând până la efecte letale. Desigur, susceptibilitatea oamenilor la factorii stresanţi este foarte diferită, acest factor putând fi foarte nociv pentru un subiect, dar lipsit de importanţă pentru altul.

În anul 1948, s-a descoperit existenţa unor relaţii particulare între sistemul nervos şi cel endocrin, şi anume guvernarea hipofizei de către secreţiile hipotalamusului. Ideea că sistemul nervos are funcţii secretorii, deşi respinsă iniţial de "autorităţile" ştiinţifice ale timpului, s-a impus, fiind acceptată în cele din urmă datorită dovezilor experimentale indubitabile. Izolarea hormonilor şi factorilor eliberaţi de către neuroni nu a fost uşoară, ea necesitând mari eforturi intelectuale şi materiale. De exemplu, numai pentru izolarea "factorului de eliberare a tireotropinei" (TRF-tireotropin releasing factor) a fost necesară disecarea a 5 000 000 creiere de oaie.

Strădanii de amploare similară au fost depuse pentru izolarea "factorului de eliberare a hormonului luteinizant" (LRF = luteinising hormone releasing factor) şi a altora. Graţie eforturilor de acest gen, s-au reuşit elucidarea ştiinţifică a proceselor biologice care intervin în instalarea şi menţinerea stresului şi identificarea rolului pe care-l au diverşi "factori stresanţi" etc. În ultimele două decenii, au fost publicate peste 20 000 de articole şi monografii care abordau acest subiect şi au fost elucidate multe aspecte referitoare la relaţiile neuro-imuno-endocrine în situaţii de stres. A devenit clar faptul că stresul psihic, de pildă, sau tulburările nervoase şi endocrine pot compromite funcţiile imune, iar unii mediatori solubili ai sistemului imun pot influenţa funcţiile sistemului nervos şi endocrin.

În scopul elucidării mecanismelor prin care stres-ul poate provoca alterări grave funcţionale şi predispune la susceptibilitate faţă de unele boli, cum ar fi de

pildă boala neoplazică, a fost dezvoltată o direcţie de cercetare interdisciplinară, "psiho-neuro-imunologia", un domeniu particular al neuro-imuno-endocrinologiei.

## UNELE MOLECULE CU IMPLICAŢII ÎN "SINDROMUL GENERAL DE ADAPTARE"

Atât celulele prokariote cât şi cele eukariote, printre componentele lor constitutive, au unele familii de molecule care în condiţii normale se găsesc în cantităţi extrem de mici, acumulându-se însă în cantităţi mari în urma agresiunilor termice, infecţioase etc. Aceste molecule sunt cunoscute sub denumirea de "proteine de stres" sau "proteine de şoc termic" (HSP = heat shok proteins) ce aparţin la diferite familii cu funcţii şi greutăţi moleculare diferite (tabelul 138).

*Tabelul 138*

**Familiile proteinelor de şoc termic (după S.H.E. Kaufman)**

| Familia | Membrii | Funcţii fiziologice | Rol posibil în răspunsul imun |
|---|---|---|---|
| HSP 90 | HSP 90 | Prevenirea legării receptorilor steroizi la ADN | Instalarea de reacţii autoimune |
| | HSP 83 | Fosforilarea tirozinkinazelor | Conferă rezistenţă tumorilor |
| HSP 70 | HSP 70 | Plierea şi deplierea proteinelor | Asamblarea imunoglobulinelor |
| | grp 78 | Translocarea proteinelor | Prelucrarea antigenelor de clasa II |
| | BiP | Asamblarea complexelor polimerice | Sunt antigene pentru multe bacterii şi virusuri |
| | | | Instalarea de reacţii autoimune |
| HSP 60 | HSP 65 | Plierea şi deplierea proteinelor | Sunt antigene pentru multe bacterii, virusuri |
| | grp EL | Asamblarea complexelor multinumerice | Instalarea de autoimunitate |
| Ubiquitina | Ubiquitina | Degradarea proteinelor | Prelucrarea antigenelor de clasa I |
| | | | Realizează ecotaxia limfocitară |
| | | | Instalarea de reacţii autoimune |

Sunt cele mai bine conservate în cursul evoluţiei filogenetice, prezenţa lor la bacterii, plante şi animale, la care îndeplinesc un rol protector pentru celule, constituind încă o dovadă a unităţii tuturor formelor de viaţă de pe pământ.

În mod normal, ele contribuie la translocarea unor proteine prin membranele celulare, la asamblarea şi dezasamblarea moleculelor de proteine, la menţierea formei normale a structurii sterice a proteinelor supraveghind şi eliminând eventualele aberaţii care ar putea interveni în cursul "buclării" lanţului polipeptidic primar în vederea realizării de structuri secundare, terţiare etc. Unele se leagă la complexe ADN în timpul replicării celulei, la veziculele "tapisate" cu clathrin în cursul fagocitozei, la unele proteine mitocondriale etc.

În familia HSP 70 există o "proteină de legare" (BiP) care, în timpul sintezei lanţurilor de imunoglobulină de către plasmocit, se leagă la lanţul *H* aflat în reticulul endoplasmic, facilitând conexiunea ulterioară la acesta a lanţului *L* şi prevenind astfel legarea prematură *H-H*. În absenţa lanţului *L*, BiP rămâne ataşată la *H*, reţinându-l în reticulul endoplasmatic atât timp cât este necesar.

HSP-60 şi HSP-70 pot realiza deplierea unor proteine citoplasmatice şi translocarea lor ulterioară în reticulul endoplasmic sau în mitocondrii. Odată ajunse aici, ele refac replierea şi, atunci când este cazul, contribuie la asamblarea lor în diferite complexe. După unii, aceste proteine ar fi implicate în asocierea $\beta 2-$microglobulinei la lanţul $\alpha$ al antigenelor MHC de clasa I şi ar avea rol în recunoaşterea şi prelucrarea antigenelor străine. Exprimarea "proteinelor de şoc termic" de către celulele infectate viral, stresate termic sau transformate neoplazic, ar contribui la evidenţierea unor epitopi care ar permite identificarea şi eliminarea lor de către sistemul imun. Dar, nu este exclus ca în unele stituaţii celulele stresate să exprime pe suprafaţa lor HSP care ar fi recunoscute de către limfocitele *T*, în special de către cele cu receptori $\gamma\delta$ şi de către limfocitele *B*, declanşând reacţii autoimune mediate celular şi umoral. Existenţa, în artrita reumatoidă, spondilita ankilozantă, lupusul eritematos sistemic, de anticorpi anti-HSP-65, -HSP-70 şi -HSP-90 ar susţine această ipoteză. În cazul expunerii celulelor la temperaturi crescute, la infecţii virale, la metaboliţii oxigenului eliberaţi în cursul proceselor inflamatorii, în deficite nutriţionale sau la diferite noxe, nivelul HSP creşte mult, ca expresie a activării genelor de la nivelul complexului MHC, creştere care are rol protector, vital, pentru celula agresionată, asigurându-i în special termorezistenţă. Desigur, rolul protector benefic pentru celulă poate fi nociv pentru ţesuturi, organe sau chiar pentru organism în totalitatea sa. Astfel, creşterea nivelului acestor proteine în interiorul bacteriilor le conferă rezistenţă faţă de atacul enzimelor lizozomale ale celulelor fagocitare, favorizând instalarea infecţiilor. Dar şi fagocitele care au înglobat bacteriile le produc în cantitate sporită pentru a se apăra, pe de o parte de atacul din interior al acestora şi pe de altă parte, de metaboliţii oxigenului pe care-i produc în vederea distrugerii materialului fagocitat. Cu alte cuvinte, atât bacteria agresoare cât şi organismul agresat folosesc mecanisme similare de protecţie unul faţă de altul. Celulele tumorale cu un nivel crescut de HSP sunt mai rezistente la acţiunea citotoxică a celulelor *NK* sau *LAK* precum şi la TNF decât cele la care aceste proteine se găsesc la un nivel scăzut. Şi celulele normale, încălzite la $+42^0$C, capătă o rezistenţă sporită. Faptul că proteinele de şoc termic au determinanţi antigenici comuni unui spectru larg de bacterii patogene şi de celule transformate, precum şi faptul că ele apar rapid după intervenţia agenţilor stresanţi, constituie în ultimă instanţă un proces benefic pentru organism în totalitatea sa. Acesta face ca, în cazul infecţiilor, sistemul imun să fie activat încă înainte de multiplicarea bacteriilor, alertându-se astfel primele linii de apărare care întârzie consolidarea agresorului şi creează o "perdea de protecţie" pentru mobilizarea factorilor de apărare specifici, în vederea atât a eliminării agresorului cât şi a evitării instalării unor boli autoimune care ar putea fi generate de HSP. Desigur, mecanismele care realizează aceste procese complexe sunt mult mai numeroase şi implică intervenţia nu numai a unui număr foarte mare de diferite populaţii moleculare, ci şi a unor sisteme funcţionale cu rol fiziologic bine precizat. Dar, în ultimă instanţă, ele nu fac altceva decât să dovedească încă o dată complexitatea sistemelor multifuncţionale ale organismului şi integrarea acestora în influenţele mediului înconjurător de la care primeşte semnale şi faţă de care reacţionează pentru a-şi menţine homeostazia.

# CONEXIUNI NEURO-ENDOCRINE

Organismul uman este un întreg armonios, alcătuit din diferite sisteme funcţionale care se influenţează şi se controlează reciproc, în vederea menţinerii în limite normale a tuturor funcţiilor lor. Nu există sisteme izolate, independente şi indiferente unele faţă de altele. În consecinţă, nici sistemele imun, nervos sau endocrin nu funcţionează izolat, ci sunt într-o strânsă asociere şi colaborare funcţională. De aceea, organele limfoide primare şi secundare sunt inervate de filete adrenergice şi colinergice şi influenţate de diverşi hormoni. Aceştia sunt secretaţi de către glandele endocrine, dar şi de către organele limfoide primare sau chiar de nervii periferici (tabelul 139).

*Tabelul 139*

**Produse cu funcţii de hormoni, secretate de către glandele endocrine, organele limfoide şi nervii periferici**

| Organul secretor | Produsul secretat | Funcţia |
|---|---|---|
| Hipofiza | Hormoni de creştere (GH)<br>Prolactina<br>Vasopresina<br>ACTH | Activează afluxul precursorilor limfocitelor *T* către timus |
| Pituitara | Vasopresina<br>Oxytocina<br>Factorul de eliberare a corticotropinei (CRF) | Stimulează creşterea epiteliului timic |
| Gonadele | Hormoni androgeni şi estrogeni | Reglează proliferarea limfoblaştilor |
| Tiroida | Hormoni tiroidieni | Modulează sinteza ARN<br>Activează mecanismele oxidative mitocondriale |
| Pancreasul | Insulina | Stimulează ATP-azele şi transportul $K^+$ prin membrana celulară |
| Suprarenalele | Glucocorticoizi<br>Enkefaline | Inhibiţia funcţiilor imune<br>Stimularea sistemului nervos |
| Timusul | Factorul umoral timic (THF)<br>Timozina V<br>Timulina<br>Timopoietina | Controlează maturarea limfocitelor *T*<br>Reglează eliberarea hormonilor hipofizari şi unele funcţii ale sistemului nervos |
| Sistemul nervos central şi periferic | Substanţa P (SP) | Influentează mastocitele şi bazofilele în eliberarea de histamină |
| | Somatostatina | Controlează eliberarea histaminei de către mastocite |
| | Peptide vasointestinale (VIP)<br>$\alpha$ - endorfine<br>$\beta$ - endorfine<br>Met-enkefaline | Mediatori potenţiali cu acţiune asupra muşchilor netezi, glandelor endocrine, funcţiilor secretorii ale limfocitelor *T* |

În tot acest context funcţional, hipotalamusul are un rol important. El primeşte informaţii din periferie şi, condiţionat de acestea, influenţează diferite funcţii ca de pildă activitatea sistemului nervos vegetativ şi secreţiile endocrine, printre care sinteza şi secreţia hormonilor adrenocorticotropi (ACTH). Acest control se realizează prin nucleii paraventriculari care sunt în conexiune cu pituitara posterioară, reponsabilă de controlul secreţiei diferiţilor factori cum ar fi vasopresina, oxitocina, factorul de eliberare a corticotropinei etc.

Hormonii endocrini şi diferite neuropeptide pot influenţa unele funcţii ale sistemului imun, celulele acestui sistem având receptori pentru ei (tabelul 140).

*Tabelul 140*

**Neurotransmiţători şi hormoni cu proprietăţi imunomodulatoare (după D.N.Khansari şi col.)**

| Produsul (factorul) secretat | Acţiunea | Efectul asupra sistemului imun |
|---|---|---|
| Glucocorticoizi | Supresie | Sinteza de anticorpi, citokine, activitate citotoxică *NK* |
| Catecolamine | Supresie | Proliferarea limfocitelor la stimuli cu mitogene |
| Acetilcolina | Activare | Creşte numărul de limfocite şi macrofage în măduvă |
| Hormoni sexuali | Supresie/Activare | Reacţiile mixte limfocitare |
| $\beta$ - endorfinele | Activare/Supresie | Sinteza de anticorpi, activarea limfocitelor *T* şi a macrofagelor |
| Metenkefalinele | Activare | În doze mici activează celulele *T* |
| Tiroxina | Activare | Activarea *T* h (formare de plaje hemolitice) |
| Dinorfina | Activare | Reacţia limfocitelor *T* la stimuli cu PHA |
| Prolactina | Activare | Activarea macrofagelor, limfocitelor *T* (producerea de IL-2) |
| Hormonul de creştere | Activare | Sinteza anticorpilor, activarea macrofagelor |
| Vasopresina | Activare | Proliferarea limfocitelor *T* |
| Oxitocina | Activare | Proliferarea limfocitelor *T* |
| ACTH | Activare/Supresie | Producerea de citokine, activitate *NK*, sinteza de anticorpi, funcţiile macrofagelor |
| Somatostatina | Supresie | Răspunsul la mitogeni, sinteza de anticorpi (plaje hemolitice) |

De exemplu, de la nivelul sistemului nervos se eliberează GIF (glucocorticoid increasing factor sau "factorul de stimulare a hormonilor glucocorticoizi") care constituie un semnal aferent care acţionează pe calea hipotalamus ⟶ hipofiză ⟶ suprarenale, realizând creşterea concentraţiei sangvine a corticosteroizilor şi instalarea imunosupresiei. În situaţii normale, adică în absenţa unor factori stresanţi, această relaţie neuroimunoendocrină poate avea un rol reglator, de control, asupra răspunsului imun. Astfel, după inocularea antigenului, în faza de răspuns imun maxim, creşte şi nivelul glucocorticoizilor din circulaţie. Această creştere este consecinţa eliberării de către monocitele şi limfocitele stimulate a

unor diverşi mediatori de genul IL-1; IL-2; IFNγ etc., care acţionează asupra pituitarei stimulând producerea de ACTH şi în final de glucocorticoizi cu efect inhibitor. La rândul lor, limfocitele, macrofagele, granulocitele produc hormoni neuroendocrini care pot influenţa funcţiile neuronilor şi glandelor cu secreţie internă (tabelul 141).

*Tabelul 141*

**Hormoni neuro-endocrini produşi de către celulele sistemului imun (după D.A.Weigent şi J.E.Blalock)**

| Hormonul | Celule secretoare | Stimulul care induce secreţia hormonului |
|---|---|---|
| Hormoni adrenocorticotropi (ACTH) | Limfocite *T* + *B* | Infecţii virale<br>LPS |
| Endorfine | Macrofage | Proteina A stafilococică |
| Tireotropina (TSH) | Celule *NK* | CRF (Factorul de eliberare a corticotropinei) |
| Gonadotropina corionică | Limfocite *T* + *B* | Reacţiile mixte limfocitare |
| Hormonii de creştere | Limfocite *T* + *B* | Produc spontan hormoni<br>Stimuli cu ConA |
| Prolactina | Limfocitele *T* | Stimuli cu ConA |
| Hormonul luteinizant (LH) | Limfocitele *T*, *B* etc. | Inductori ai LH |

Hormonii neuroendocrini sintetizaţi de către celulele sistemului imun au aceeaşi structură, secvenţă de aminoacizi, greutate moleculară şi activitate biologică, ca şi cei produşi de către celulele nervoase sau glandele endocrine (tabelul 142). Interacţia dintre ei şi receptorii de pe suprafaţa acestor celule activează formarea intracitoplasmatică a unor mesageri de genul cAMP, cGMP etc., dereglarea raporturilor funcţionale existente în limite normale între ei şi, în final, alterarea funcţiilor celulei.

*Tabelul 142*

**Receptorii pentru hormonii neuroendocrini existenţi pe suprafaţa celulei sistemului imun (după D.A.Weigent şi J.E.Blalock)**

| Receptori pentru | Celulele pe suprafaţa cărora sunt prezenţi |
|---|---|
| Corticotropină | Limfocitele *T* şi *B* |
| Factorul de eliberare a corticotropinei (CRF) | Leucocitele mononucleare |
| Endorfine | Limfocitele *T* şi *B* |
| Tireotropină | Limfocitele *T* |
| Hormonul de eliberare a tireotropinei (TRH) | Leucocitele mononucleare |
| Hormoni de creştere (GH) | Leucocitele mononucleare |
| Substanţa P | Limfocitele *T* |
| Peptida intestinală vasoactivă (VIP) | Limfocitele *T* |

Diferite limfokine sau monokine pot regla unele funcţii neuro-endocrine dovedindu-se a avea adevărate proprietăţi de hormoni. De exemplu, interferonii, IL-1 şi IL-2, timozina $\alpha$1 şi $\beta$4 provoacă analgezii, stimulează sinteza de *propiomelanocortină* etc. Toate acestea dovedesc că cele trei sisteme folosesc aceleaşi molecule de semnalizare, prin intermediul cărora se realizează nu numai comunicaţiile între diferitele celule aparţinând unui sistem funcţional, deci comunicaţii "intrasistem", dar şi între diferite sisteme, deci "intersistem" (fig. 217).

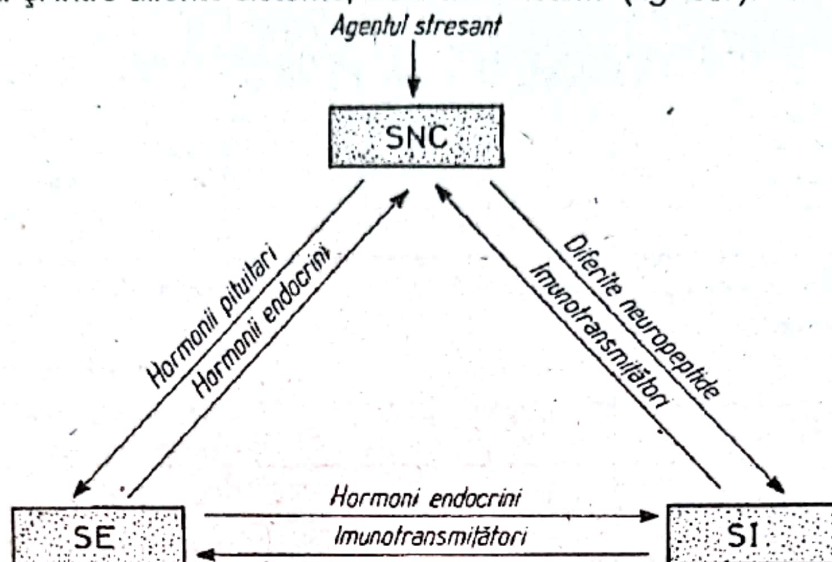



Fig.217. Conexiuni între sistemul nervos central (SNC), imun (SI) şi endocrin (SE) care pot fi dereglate de către intervenţia intempestivă a unui agent stresant. Aceste trei sisteme se găsesc într-o permanentă "informare reciprocă" prin intermediul unor neuropeptide sau hormoni. O intervenţie brutală asupra unuia dintre cele trei sisteme participante la această "triadă" duce la dereglări funcţionale grave.

Deci, lanţul reacţional declanşat de către intervenţia intempestivă a unui agent stresant antrenează o cascadă de mesaje care perturbă reversibil, dar uneori şi ireversibil, o multitudine de funcţii biologice (fig. 218).

Organismul este o structură biologică unitară, perfectă. De aceea, modificările care se instalează în unul sau altul din compartimentele sale funcţionale vor influenţa restul organelor sau ţesuturilor care, uneori, nu mai pot depăşi momentul critic al "stadiului de adaptare".

## FACTORII STRESANŢI

Sindromul "general de adaptare" se poate instala după un impact brutal al organismului cu unii "factori stresanţi". Aceştia sunt multipli, unii dintre ei acţionând foarte violent, iar alţii, care de fapt reprezintă majoritatea, insidios. Este indiscutabil că o infecţie bacteriană gravă, o intoxicaţie alimentară sau chimică pot perturba profund homeostazia, obligând organismul să reacţioneze pentru a rezista. Desigur, aceşti factori acţionează brutal, aşa că reacţia faţă de ei nu constituie o "surpriză". Dar sunt situaţii în care întregul echilibru al organismului este deviat în mod lent de la parametrii normali de funcţionare de către agenţi aparent "inofensivi". Încă de la jumătatea acestui secol, R.DUBOS şi J.SCHAEDLER, luând ca idicator raportul existent în mod normal între flora Gram-pozitivă şi cea Gram-

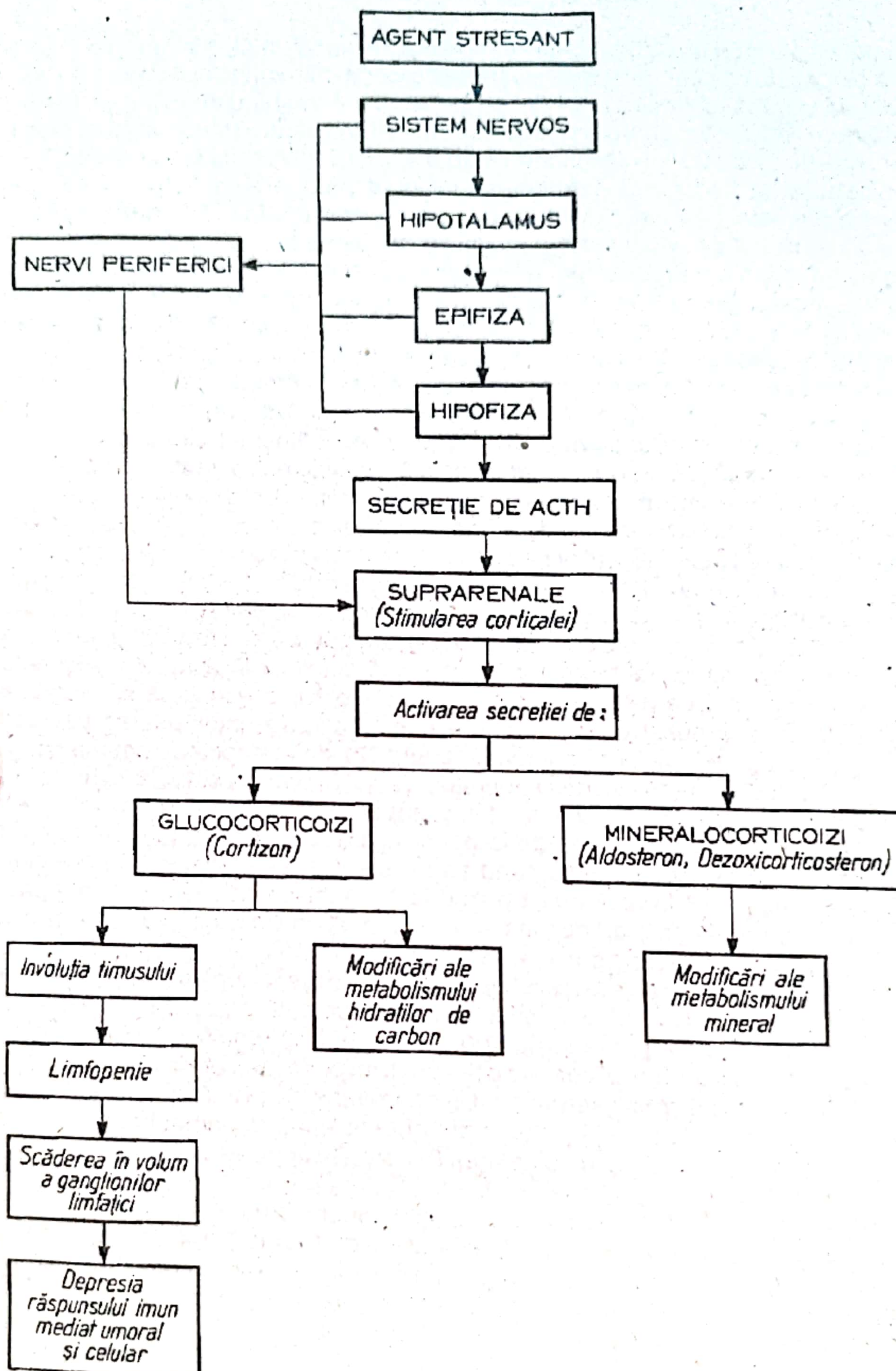



Fig. 218. Conexiuni neuro-imuno-endocrine susceptibile la modificări în cursul sindromului de adaptare.

negativă din intestinul şoarecelui, demonstrau experimental, într-o manieră simplă dar elegantă, că acest echilibru poate fi alterat de către un simplu zgomot sau de contenţionarea animalului, chiar şi atunci când manipularea lui se face cu blândeţe. Într-un experiment similar, constatam că şoarecii transportaţi cu maşina pe o distanţă de 20 km reacţionau slab la stimulii antigenici şi deveneau foarte susceptibili la infecţii cu germenii condiţionat patogeni sau chiar nepatogeni pentru animalele care nu "călătoriseră". Femelele s-au dovedit a fi mai sensibile din acest punct de vedere decât masculii. La aceste animale au acţionat în fond nişte agenţi "psiho-sociali". Venirea în contact, în cutiile în care au fost transportaţi, cu alţi şoareci de care au trăit izolat până atunci, aglomerarea în timpul transportului, manipulările necesare transferului lor din încăperile în care trăiau în maşină, zgomotul motorului etc. au fost tot atâţia factori de agresiune.

La oameni, se întâlnesc practic aceleaşi situaţii, dar frecvenţa şi complexitatea lor sunt mult mai mari de obicei. Circulaţia pe străzile aglomerate este mai stresantă pentru conducătorul auto mai puţin experimentat sau străin de oraş, zgomotele prelungite, certurile, neplăcerile la serviciu etc. îşi pot pune amprenta lor negativă, alterând mai mult sau mai puţin profund *status-quo-ul* individual. Impactul psiho-social este foarte evident la subiecţii cu un echilibru fiziologic precar, cum ar fi de pildă cel al pacienţilor cu tumori solide. Este cunoscut faptul că boala neoplazică este asociată cu o imunodepresie mai mult sau mai puţin evidentă. Un timp, mai ales după extirparea tumorii, majoritatea bolnavilor se simt bine, aproape normal. Este suficient însă un stres psihic sau fizic, intervenit chiar după mulţi ani de la operaţie, care nu are nici o influenţă asupra persoanelor sănătoase, pentru ca tumora să recidiveze, să metastazeze şi să se ajungă la exitus. Cazuri de acest gen sunt foarte numeroase. De exemplu, se pare a fi ilustrativ cazul unei paciente operată în anul 1971 de adenocarcinom mamar. În anul 1988, deci după 17 ani de la operaţie, pleacă în oraş cu soţul iar la revenirea acasă constată că aceasta a fost jefuită. După aproximativ o lună de zile de la acest eveniment, pe cicatricea de la operaţie a apărut o mică tumoretă care a crescut vertiginos, bolnava începând să tuşească şi să slăbească în greutate. Două luni mai târziu, la radiografia pulmonară, se observă zone nodulare opace cu extindere rapidă care au dus la deces. Mai mult ca sigur că în acest caz axul neuro-imuno-endocrin şi-a spus cuvântul.

Dar, de multe ori, la acelaşi rezultat nefast se ajunge şi după excitaţii cerebrale generate de către "evenimente plăcute". Unui cercetător suferind de cancer pulmonar care, printr-o terapie imunomodulatoare corect aplicată, a putut fi menţinut mai mulţi ani într-o stare de echilibru fiziologic, i se comunică acceptarea unei lucrări la un congres internaţional, fiind invitat s-o susţină. În culmea fericirii pleacă, dar emoţiile, stres-ul de transport, oboseala, au deprimat funcţiile imune favorizând recrudescenţa şi diseminarea tumorii. Desigur, exemple de acest gen sunt numeroase.

Toate acestea sunt dovezi indubitabile ale rolului sistemelor neuro-imuno-endocrine în menţinerea homeostaziei, a condiţiei de "normal". De aceea, dacă nu se pot elimina toate noxele fizice şi chimice din natură şi toate agresiunile psiho-sociale care însoţesc civilizaţia actuală, ar fi bine ca cel puţin medicii să cunoască ceva mai mult despre "sindromul de stres". Numai aşa ei îi vor scuti pe bolnavi de chemări (uneori inutile) la "control" sau "analize" şi de stres-ul generat de aşteptarea la uşa cabinetului medical.

# GLOSAR

*AA.* Acid arahidonic.

*Absorbţie.* Reţinerea în masa unui lichid a unor particule care au venit în contact cu acesta.

*ACTH.* Hormoni adrenocorticotropi.

*ACy.* Adenilat-ciclază.

*AcPh.* Acid fosfatidilic.

*ADCC.* Citotoxicitate mediată celular dependentă de anticorpi (antibody dependent cellular cytotoxicity).

*Adjuvant.* Substanţă care măreşte imunogenitatea antigenului atunci când este administrată împreună cu acesta.

*ADN.* Acid deoxiribonucleic.

*ADP; ATP.* Adenozin-difosfat; adenozin-trifosfat.

*ATP-ază.* Adenozin-trifosfatază.

*Adsorbţie.* Fixarea, "lipirea" unor molecule sau particule aflate în soluţie pe suporturi solide de genul bilelor de plastic, hematiilor etc.

*Afinitate (intrinsecă).* Forţa de legare realizată între un epitop şi un situs combinativ al unei molecule de anticorp.

*Afinitatea funcţională.* Vezi "aviditate".

*Agammaglobulinemie.* Absenţa sau scăderea imunoglobulinelor în ser până la valori foarte mici, uneori greu de detectat.

*Aglutinare.* Reacţie antigen-anticorp care determină formarea de "aglomerate" vizibile.

*Alelă.* Exprimare fenotipică a variaţiei unui locus genetic în interiorul speciei.

*Alergie.* Reacţie patologică, exagerată ca intensitate, la un stimul antigenic.

*Alexină.* Denumirea iniţială a complementului.

*Aloanticorp.* Anticorp care recunoaşte aloantigenele.

*Aloantigen.* Antigen codificat de un locus genetic comun. Altfel spus, proteinele unui individ sunt recunoscute ca antigene de către limfocitele altui individ din cadrul aceleiaşi specii.

*Alogen.* Diferenţă antigenică între proteinele a doi indivizi din cadrul aceleiaşi specii.

*Alotip.* Determinanţi antigenici la nivelul diferitelor regiuni ale moleculelor de imunoglobuline, caracteristice unor indivizi din cadrul aceleiaşi specii.

*Amine vasoactive.* Substanţe eliberate de către mastocite, bazofile sau trombocite (histamină, serotonină etc.), cu acţiune asupra endoteliilor şi muşchilor netezi.

*Anafilaxie.* Hipersensibilitate de tip I mediată de către anticorpi IgE (în special fixaţi citofilic).

*Angajată.* Celulă stimulată, în curs de exprimare a funcţiei efectoare.

*Anticorp.* Moleculă de imunoglobulină cu funcţie de recunoaştere specifică a antigenului.

*Anticorp citofil.* Anticorp care se leagă la membrana plasmatică a celulelor prin fragmentul *Fc*.

*Anticorpi naturali.* Anticorpi sintetizaţi ca urmare a unor stimulări naturale şi nu deliberate.

*Antigen.* Molecule care induc sinteza de anticorpi.

*Antigen timus-dependent.* Structuri moleculare care necesită, pentru producerea de anticorpi, cooperarea limfocitelor *T* şi *B*.

*Antigen timus-independent.* Sunt antigene care, pentru a stimula sinteza de anticorpi, nu au nevoie de ajutorul limfocitelor *T*, fiind suficientă doar participarea celor *B*.

*Apoptosis.* Moartea programată genetic a celulei.

*Atopie.* Răspuns anormal, exagerat, la un stimul antigenic normal, caracterizat prin producerea masivă de anticorpi din clasa IgE.

*ARN.* Acid ribonucleic.

*Autoantigen.* Molecule potenţial antigenice pentru propriul organism, care sunt "tolerate" de către acesta. În cazul ruperii "toleranţei", generează răspuns imun şi boli autoimune.

*Autocrin.* Acţiunea unui hormon asupra celulei care l-a sintetizat şi excretat.

*Autolog.* Component care aparţine propriului oganism.

*Autosomi.* Cromozomi care nu sunt legaţi de sex (X şi Y).

*Aviditate.* Forţa de legare între un antigen complex şi toate situsurile combinative ale unei molecule de imunoglobulină. Cu cât anticorpul are mai multe situsuri combinative, deci mai multe valenţe, cu atât va lega mai "avid" antigenul.

*Axenic.* Axenos = "lipsit de străini". Animal lipsit de germeni patogeni şi nepatogeni. Sinonim: germ-free. Sunt animale crescute în incubatoare speciale după ce au fost extrase prin cezariană şi alimentate cu hrană sterilă.

*BHT.* Butirat de hidroxitoluen.

*Blast.* Celulă cu nucleu mare, cu nucleolii evidenţi, cu citoplasmă redusă, raportul nucleu/citoplasmă fiind în favoarea nucleului. Este un stadiu intermediar al procesului de diviziune celulară consecutiv unui stimul antigenic sau mitogenic.

*Blastogeneză.* Proces în cursul căruia are loc formarea blaştilor, cunoscut şi sub denumirea de "transformare blastică" sau "dediferenţiere blastică".

*Boala "pipernicirii".* Un sindrom instalat consecutiv timectomiei neonatale sau iradierii letale a şoarecilor. Animalele nu cresc în greutate, se "pipernicesc", au diaree, părul murdar şi aglutinat şi sunt foarte susceptibile la infecţii bacteriene sau virale. Nu rejectează alogrefele. Cauza acestui sindrom este absenţa limfocitelor *T*. Sinonime: "runt disease" sau "wasting disease".

*Booster.* Rapel.

*Bystander cell.* Celulă "spectatoare", care nu participă activ la reacţiile imune.

*By-pass.* "Prin ocolire". Termenul este folosit pentru acele reacţii imune care se fac "indirect", adică prin antrenarea altor căi reacţionale.

*Cap.* "Bonetă". Moleculele sau complexele moleculare de pe suprafaţa membranei celulare se aglomerează la un pol al celulei, formând o "bonetă" sau "glugă" care este internalizată.

*Capping.* Termen englez pentru procesul de formare de "glugă" sau "bonetă".

*Captare.* Înglobarea selectivă în celulă a unor molecule străine.

*Carrier.* Gruparea purtătoare din componenţa antigenului care "poartă" epitopii sau "grupările determinante".

*Caşexină.* Termen sinonim cu TNF-$\alpha$.

*CD*. "Clusters of differentiation", termen anglosaxon care ar putea fi tradus aproximativ prin "clasele de diferenţiere" sau "diferenţierea dintr-un grup". Defineşte moleculele de pe suprafaţa celulelor sistemului imun cu proprietăţi antigenice specifice.

*CDR*. "Regiune de determinare a complementarităţii" sau "complementarity determining region". Sunt porţiuni hipervariabile de la nivelul regiunii variabile a moleculelor de anticorp sau a receptorilor pentru antigen de pe limfocitul *T*, din cadrul situsului combinativ.

*Celulă accesorie*. Celulă cu funcţii imune ajutătoare, nespecifice.

*Celulă ajutătoare*. Subpopulaţie de limfocite *T* care ajută funcţional alte limfocite *T*, *B* etc. în reacţia lor faţă de antigen (termen anglo-saxon: helper). Recunosc antigenul prezentat de către celulele prezentatoare de antigen, în asociere cu moleculele MHC de clasa II.

*Celulă angajată*. Celulă stimulată de către antigen, care se angajează pe o linie de diferenţiere, în vederea efectuării unei funcţii imune.

*Celulă citolitică*. Termen sinonim cu "celulă citotoxică".

*Celulă citotoxică*. Celulă care ucide specific sau nespecific alte celule.

*Celulă competentă*. Celulă capabilă să recunoască specific şi să neutralizeze antigenul.

*Celulă "educată"*. Celulă imunocompetentă care a venit în contact cu antigenul.

*Celulă formatoare de plaje hemolitice*. Plasmocit care sintetizează şi secretă anticorpi. Dacă este înglobat într-un mediu semisolid în care se găsesc hematii de oaie care au folosit ca antigen, anticorpii antihematie secretaţi vor difuza în mediul înconjurător, se vor fixa specific pe hematii, formând complexe care pot activa complementul. Liza dată de acesta apare sub formă de puncte transparente în pânza de hematii, cunoscute sub denumirea de "plaje hemolitice".

*Celulă formatoare de rozete*. Celule care pot lega în jurul lor, prin receptorii de membrană, alte celule (des utilizate sunt hematiile) care se dispun în jurul celulei formatoare de rozete, sub formă de rozetă.

*Celulă incompetentă*. Celulă tânără care nu şi-a exprimat receptorii pentru antigen deoarece încă nu a fost "educată" în "timus" sau măduva osoasă.

*Celulă K* ("killer"). Limfocit sau monocit cu receptori pentru *Fc*, celulă efectoare a citotoxicităţii ADCC.

*Celulă L*. Limfocit "labil" care fixează labil pe suprafaţa sa moleculele IgG. La temperatura de 37$^0$C şi la *pH* acid, moleculele ataşate se desprind de celulă.

*Celulele limfoide*. Celulele sistemului imun descendente din seria "limfoidă". Clasele majore sunt limfocitele *T* şi *B*.

*Celula matcă*. Celulă pluripotentă, apărută în sacul vitelin şi ficatul embrionar, din care descind toate celulele existente în circulaţia sangvină. Termenii sinonimi: "şuşă", "stem", "formatoare de colonii".

*Celulă de memorie*. Limfocit *T* sau *B* care a venit în contact cu antigenul şi care exprimă receptori pentru acesta.

*Celulă NK*. Recunoaşte selectiv şi distruge unele celule tumorale sau infectate, în afara restricţiei MHC.

*Celulă precursoare*. Celulă tânără, angajată pe o cale de maturare din care va deriva o celulă efectoare a unei funcţii imune.

*Celulă prezentatoare de antigen*. Celulă care poate reţine şi prelucra antigenul, pe care-l prezintă apoi, într-o formă convenabilă altor celule, în asociere cu moleculele codificate de MHC ("sub restricţie MHC") sau în afara acestei restricţii. Sinonim: APC (antigen presenting cell).

*Celulă "ţintă".* Celulă care este ucisă de către celula citotoxică, fiind "ţintită" specific sau selectiv de către aceasta.

*Celulă ucigaşă.* Sinonim cu celulă citotoxică (killer).

*Celulă "virgină".* Celulă care a fost educată în timus *(T)* sau măduvă *(B)* unde şi-a căpătat competenţa funcţională, dar încă nu a avut ocazia să-şi exercite funcţiile deoarece nu a întâlnit antigenul.

*Chemotaxie.* Mişcare direcţionată a unei celule sub influenţa unor agenţi chemotactici (care o atrag spre un anumit loc).

*Ciclul celular.* Este un ansamblu de procese biochimice care se finalizează cu diviziunea celulară, celula trecând prin etapele $G_0$, $G_1S$, S, $G_2$ şi M. Replicarea semiconservativă a ADN-ului survine în cursul fazei S. În faza M (de mitoză) celula se divide.

*Citofilie.* Proprietatea imunoglobulinelor de a se ataşa la celule prin fragmentul *Fc*.

*Citokine.* Moleculele solubile care realizează comunicarea între diferite celule controlându-le diferenţierea, maturarea etc.

*Citostatic.* Efect biologic exprimat prin inhibiţia multiplicării celulei cu blocarea proceselor metabolice, fără acţiune letală asupra ei.

*Citotoxic.* Factori cu acţiune letală asupra celulei.

*Citotoxicitate dependentă de anticorpi.* Vezi ADCC.

*Citotoxicitate dependentă de complement.* Efect citotoxic datorat acţiunii litice a complementului, activat consecutiv fixării specifice (prin *Fab*) a anticorpilor pe suprafaţa celulei.

*Citotoxicitate mediată celular.* Uciderea unei celule ţintă prin intervenţia directă a altor celule cu potenţial citotoxic.

*Clonă.* O populaţie de limfocite *T* sau *B* care au receptori cu specificitate de recunoaştere pentru un anumit antigen ("receptor clonotipic").

*Coizogenic.* Vezi *Congenic.*

*Commited.* Celulă angajată pe o anumită direcţie de maturare funcţională.

*Compatibilitate.* Celule care exprimă molecule MHC de clasa I sau II, identice.

*Comutare izotipică.* Proces prin care un plasmocit îşi poate asocia produsul genelor *C* al lanţurilor *H* la produsul genelor *V*. Rezultă o moleculă de anticorp cu aceeaşi specificitate de recunoaştere a antigenului, dar cu specificitate izotipică diferită (aparţine altei clase de imunoglobulină).

*Competiţia antigenică.* O depresie specifică a răspunsului imun faţă de un antigen provocată de răspunsul imun specific altui antigen. Altfel spus, un antigen poate fi "stânjenit" în activitatea sa stimulantă de către un alt antigen.

*Complex major de histocompatibilitate.* Segmentul de cromozom la nivelul căruia sunt loci pentru genele care controlează antigenele de histocompatibilitate.

*Consangvin.* Populaţie de animale de laborator care are toţi indivizii identici din punct de vedere al MHC. Se obţin prin "consangvinizare", adică prin împerechere frate x soră timp de minimum 20 de generaţii.

*Congenic.* Animale cu genotipuri identice, care diferă între ele doar printr-un singur marker genetic, produs al unei gene. Sinonim: coizogenic.

*Crioglobuline.* Imunoglobuline serice care precipită la temperaturi scăzute (în jur de $0^{\circ}C$) şi se redizolvă o dată cu creşterea temperaturii.

*Degranulare.* Exocitoza granulelor care conţin amine vasoactive sau limfotoxine. Degranulează mastocitele, bazofilele.

*Depleţie.* Eliminarea unei celule, molecule, gene etc.

*Depresie.* Diminuarea unei funcţii biologice până la valori scăzute, fără anularea ei totală.

*Derepresie.* Anularea unui efect inhibitor sau represor, urmată de revenirea la starea normală de exprimare a funcției.

*Determinant antigenic.* Porțiunea din molecula de antigen care îi imprimă specificitatea antigenică. Sinonim : "epitop".

*DFX.* Desferioxamină (chelator al $Fe^{2+}$).

*DMSO.* Dimetilsulfoxid.

*DMTU.* Dimetiltiouree.

*Domeniu.* Regiunea unui peptid care are o structură primară, secundară și terțiară caracterizată printr-o anumită organizare. Organizarea în domenii caracterizează polipeptidele produse de către genele "superfamilei imunoglobulinelor".

*Ecotaxie.* "Plecarea către casă" a limfocitelor din circulația periferică, adică, cantonarea lor în "ariile specifice" sau de "dependență". Sinonim: homing.

*Efector.* Celulă imunocompetentă care efectuează o anumită funcție imună (citotoxică, de sinteză etc.).

*ELISA.* Enzyme Linked Immunosorbent Assay, sau "dozare imunoenzimatică".

*Endocitoză.* Proces de captare și introducere în interiorul celulei (internalizare) a unor molecule sau particule.

*Endogen.* Element care are origine internă (format în interiorul unei celule, al întregului organism etc.).

*Epitop.* Termen sinonim cu "grupare determinantă".

*Excludere alelică.* Exprimarea fenotipică a unei singure alele dominante, cu inhibarea alelei recesive. Cu alte cuvinte, exprimarea unui caracter în dauna altui caracter care este represat.

*Exocitoză.* Eliminarea în exterior a unor molecule din interiorul celulei.

*Exogen.* Factor sau component care provine din exteriorul organismului.

*Exon.* Segment de genă care codifică pentru o proteină.

*Fab.* Partea moleculei de imunoglobulină de la extremitatea $NH_2$ terminală la nivelul căreia se găsește locul de recunoaștere a antigenului (*Fab* = fragment antigen-binding = fragment care leagă antigenul).

*Facilitare.* Prelungirea duratei de supraviețuire a grefei de către anticorpii care recunosc antigenele grefonului.

*Factor reumatoid.* Autoanticorp din clasa IgG su IgM care reacționează cu fragmentul *Fc* al IgG autolog prezent în serul și în lichidul articular al bolnavilor cu artrită reumatoidă.

*Fagocit.* Celulă cu funcție fagocitară.

*Fagocitoză.* Proces prin care se realizează internalizarea și degradarea particulelor introduse intracitoplasmatic.

*Fc.* "Fragment cristalizabil". Porțiunea de lanț greu *(H)* dinspre extremitatea COOH terminală, formată din ultimele două sau trei domenii constante care, după digestia enzimatică, cristalizează.

*FcR.* Receptori pe membrana plasmatică a celulelor care fixează citofil *Fc*.

*Feedback.* "Conexiune inversă", sau, "controlul reacției prin produs final". De pildă, anticorpii sintetizați în exces inhibă sinteza altor anticorpi.

*Fenotip.* Caracteristici cu determinism genetic care sunt evidente somatic (sunt "exprimate fenotipic", se "văd").

*Flagelină.* Proteină abundentă în flagelii germenilor Gram-negativi. Sunt antigene timoindependente, sub formă de monomeri dar mai ales de polimeri cu greutatea moleculară mare (100 000 kD).

*Fosfataze.* Enzime responsabile de defosforilarea proteinelor.

*Gammaglobuline.* Globuline serice care în câmp electric migrează în regiunea "gamma" (spre catod). Sinonim: imunoglobuline sau anticorpi.

*Germ-free.* Vezi "axenic".

*GDP; GTP.* Guanidin-difosfat; guanidin-trifosfat.

*Gnotobiotic.* Animale la care se cunoaşte precis flora bacteriană cu care sunt contaminate (*gnotos* = cunoscut; *bios* = viaţă). Practic, din animale axenice se obţin gnotobiotice prin infectarea lor deliberată cu o specie sau mai multe specii de germeni.

*Grupare determinantă.* Vezi "epitop".

*Grupare purtătoare.* Partea din molecula de antigen care "poartă" epitopii (sinonim: "carrier").

*H-2.* Denumirea complexului major de histocompatibilitate la şoarece.

*$H_2O_2$.* Apa oxigenată sau peroxidul de hidrogen.

*Haplotip.* Ansamblul de alele asociate, existente pe un segment cromozomial.

*Haptenă.* Moleculă de antigen, cu greutate moleculară mică, care poate reacţiona cu anticorpul, dar nu poate induce sinteza acestuia (deoarece are nevoie de gruparea "purtătoare").

*Hemocitoblast.* Celulă mare, tânără, derivată din celula matcă.

*Hemoliza în gel.* Tehnică prin care se pune în evidenţă existenţa plasmocitelor care secretă anticorpi (vezi "Plaje" - "Celule formatoare de plaje hemolitice").

*Heterolog.* Specificităţi antigenice aparţinând indivizilor unor specii diferite.

*Heterozigot.* Subiecţi purtători a două haplotipuri diferite.

*Hibridom.* Linii celulare create *in vitro* prin fuzionarea unor celule tumorale cu limfocite stimulate antigenic. Hibridoamele sunt folosite pentru obţinerea anticorpilor monoclonali.

*Himeră.* Coexistenţa în organismul unui individ a două sau mai multe tipuri de celule care aparţin la indivizi diferiţi genetic între ei, fără a se observa reacţii imune de eliminare.

*Hiperimunizare.* Imunizare obţinută prin administrări repetate de antigen, în scopul obţinerii de anticorpi cu titru ridicat.

*Hipersensibilitate.* Răspuns imun anormal de intens faţă de un stimul antigenic normal, în cursul căruia se pot instala leziuni tisulare.

*Histocompatibilitate.* Compatibilitate între ţesuturi, capacitatea unui organism de a accepta grefele de ţesuturi acceptabile pentru el sub raportul specificităţii MHC.

*HLA.* Denumirea complexului major de compatibilitate la om (Human Leukocyte Antigens = antigene leucocitare umane).

*Homing.* Vezi "ecotaxie".

*Homogrefă.* Grefă provenită de la un donator care aparţine aceleiaşi specii din care face parte şi receptorul, dar care este diferit sub raportul antigenelor MHC.

*Homozigot.* Indivizi purtători ai unui haplotip unic.

*ICAM.* Molecule care realizează adeziuni intercelulare (Intercellular Adhesion Molecules = molecule de adeziune interceluară).

*Idiotip.* Ansamblu de caracteristici antigenice ale regiunii variabile a unei molecule de anticorp sau a unui receptor pentru antigen de pe limfocitul *T*, determinat de conformaţia sterică a epitopului pe care anticorpul sau celulele îl recunosc specific.

*IFN.* Interferoni.

*IL.* Interleukine.

*Imunitate.* Starea de nereceptivitate, dobândită în urma contactului cu antigenul.

*Imunitate mediată celular.* Răspuns imun efectuat de către celule, putând fi transferat la alt organism numai prin celule.

*Imunitate mediată umoral.* Răspuns imun efectuat de către molecule (anticorpi), care poate fi transferat la alt organism prin administrarea pasivă de ser imun.

*Imunocompetent.* Organism sau celulă competentă imunologic.

*Imunodeficit.* Situaţie în care răspunsul imun nu se poate realiza la parametrii normali datorită unor disfuncţii la nivelul sistemului imun, endocrin etc.

*Imunogen.* Substanţă antigenică, care poate declanşa cinetic un răspuns imun.

*Imunoglobuline.* Gammaglobuline cu funcţie de anticorpi.

*Imunomodulare.* Procedeu prin care se realizează activarea sau reglarea nespecifică a funcţiilor imune.

*Inactivare.* Distrugerea unei proprietăţi biologice prin diferite procedee fizice sau chimice (inactivarea bacteriilor, virusurilor, toxinelor etc.).

*Inbred.* Vezi "consangvin".

*Incompatibilitate.* Neacceptarea, de către sistemul imun al gazdei, a ţesuturilor donatorului care diferă la nivelul antigenelor de histocompatibilitate.

*Inhibiţie.* Blocarea sau diminuarea potenţialului de exprimare a unei funcţii sau unui caracter.

*Integrine.* Familii de molecule de adeziune.

*Interleukine.* Molecule secretate de căre diferite celule ale sistemului imun sau neimun, cu diferite funcţii de mesageri umorali.

*Intradermoreacţie.* (IDR). Reacţie cutanată la tuberculină sau PPD. Bolnávii de tuberculoză sau cei care au avut contact cu produsele b.K reacţionează prin congestie şi edem la locul de inoculare a PPD (hipersensibilitate de tip IV).

*Intron.* Segment genetic nefuncţional care nu codifică situat între doi exoni.

*Izoelectrofocusing.* Procedeu de separare a moleculelor pe baza încărcăturii lor electrice. Fiecare moleculă migrează la un *p*H izoelectric, unde nu sunt nici sarcini electric pozitive, nici sarcini negative.

*Izogrefă.* Transplantarea unui grefon de la un donator la un receptor identic sub raportul antigenelor MHC. Izogrefa este posibilă numai la gemenii univitelini şi la animalele consangvine. Sinonim: singenic.

*Izolog.* Identitate la nivelul MHC între indivizi diferiţi care aparţin aceleiaşi specii şi care provin din sarcină univitelină sau, în cazul animalelor de laborator, din consangvinizări.

*Izotip.* Variaţie genetică în interiorul unei familii de proteine, în cadrul aceleiaşi specii. Toţi indivizii speciei, deşi diferă genetic între ei, au acelaşi izotip, cum ar fi de pildă structura izotipică a imunoglobulinelor exprimată prin existenţa celor cinci clase. Toţi oamenii normali posedă cele cinci clase de imunoglobulină, deci aceleaşi specificităţi izotipice.

*Kinaze.* Enzime care fosforilează proteinele.

*Lanţ J.* Lanţ de "unire", care leagă monomerii moleculelor în dimeri sau polimeri de imunoglobuline. Este prezent la clasele IgA şi IgM.

*Lectină.* Proteine, de regulă de origine vegetală, care se leagă la hidraţii de carbon existenţi la nivelul membranei celulare, aglutinându-le sau stimulându-le multiplicarea.

*Leucotriene.* Metaboliţi ai acidului arahidonic cu rol în procesele inflamatorii. Provoacă bronhoconstricţii, vasodilataţii etc. Termen prescurtat: LT.

*LFA.* "Molecule asociate funcţiilor limfocitelor", cu rol în adeziunea celulelor (LFA= "lymphocyte function associated").

*LGL.* "Large granular cell", limfocit mare, cu granule citoplasmatice. Sunt celule citotoxice *K* şi *NK*.

*Ligand*. Moleculă care se leagă la un receptor de pe membrana plasmatică a unei celule.

*Limfoblast*. Limfocit transformat blastic.

*Limfokină*. Citokină sintetizată de către limfocite.

*Limfotoxină*. Limfokine cu efect toxic pentru celule, secretate în special de către limfocitele *T* activate.

*Linie*. Termenul defineşte o populaţie de celule sau de animale de laborator cu caractere genetice şi biologice bine definite, transmisibile la descendenţi.

*Linie germinativă*. Materialul genetic transmis prin gameţi. Este informaţia înscrisă în genom şi transmisă de-a lungul generaţiilor.

*Linkage*. Transmiterea la urmaşi a unor gene care se găsesc în poziţii apropiate pe cromozom.

*Lipopolizaharizi* (LPS). Molecule existente în pereţii germenilor Gram-negativi. Activează complementul pe cale alternativă şi sunt mitogene (activatori policlonali) pentru limfocitele *B* de şoarece.

*Liposom*. Fosfolipide organizate în dublu strat, de regulă de formă sferică, obţinute prin dispersia lipidelor în apă. Sunt un instrument util pentru studierea modului de formare a membranei celulare.

*LLC*. Termen prescurtat pentru - "leucemie limfatică cronică" *T* (LLCT) sau *B* (LLCB).

*Locus*. Poziţia pe cromozom a unei gene (plural "loci").

*LT*. Vezi: leucotriene.

*Macrofag activat*. Macrofag care are funcţiile intens stimulate, consecutiv semnalelor primite de la diverse citokine sau imunomodulatori.

*Macrofag "armat"*. Macrofag care a fixat citofil molecule de anticorpi. Prin *Fab*, acestea recunosc antigenul, iar prin *Fc* se leagă la *Fc*R de pe membrana macrofagului, făcându-l mult mai eficient funcţional.

*Macroglobulinemie Waldenström*. Proliferarea necontrolată a unor clone de limfocite *B* care, devenind plasmocite, secretă IgM în cantităţi mari.

*MAF*. Macrophage Activating Factor = factorul de activare a macrofagelor.

*MAgF*. Macrophage Agglutinating Factor = factorul de aglutinare a macrofagelor.

*MAG*. Monoacilglicerol.

*Marker*. Caracter particular propriu unei populaţii de celule. Pot fi markeri morfologici, funcţionali sau antigenici. Markerii antigenici sunt molecule situate pe suprafaţa celulelor care pot fi identificate prin diferite tehnici, dintre care cea mai utilizată este cea care foloseşte anticorpii monoclonali.

*Memorie imunologică*. Capacitatea celulelor limfoide de a păstra informaţia despre antigen după primul contact cu acesta (stimul primar). La un nou contact (stimul secundar), celulele reacţionează mult mai violent.

*MHC*. Major Histocompatibility Complex, sau Complexul major de histocompatibilitate.

*Miastenia gravis*. Boală autoimună produsă de către anticorpii care blochează receptorii acetil-colinici de la nivelul sinapselor neuro-musculare. Este însoţită de hiperplazie timică şi de disfuncţii ale acestui organ.

*Mielom multiplu*. Proliferare neoplazică a limfocitelor *B* care, devenind plasmocite, secretă necontrolat diferite clase de imunoglobuline. Pot fi mieloame monoclonale când se produc în cantităţi mari imunoglobuline aparţinând unei singure clase (IgG, IgA etc.), sau policlonale când sunt secretate concomitent mai multe clase de imunoglobuline.

*MIF*. Macrophage Inhibition Factor = factorul de inhibiţie a migrării macrofagelor.

*Mitogen.* Micro- sau macromolecule care stimulează proliferarea policlonală a limfocitelor. Pot fi de origine bacteriană (LPS), vegetală sau animală (lectine, anticorpi anti-limfocitari etc.). Sinonim: activatori policlonali.

*MLR.* Myxed Lymphocyte Reaction sau reacţie mixtă limfocitară. Termenul defineşte stimularea *in vitro* a limfocitelor de către celulele alogene.

*Modulare antigenică.* Înlocuirea temporară a unui determinant antigenic, exprimat pe suprafaţa celulei, cu un alt determinant. De regulă, "pierderea" temporară a antigenului se face prin "capping" sau prin "raderea" lui de către enzime.

*Monoclonal.* Produs, de regulă imunoglobuline, derivat dintr-o singură clonă de celule, cu unică specificitate de recunoaştere a epitopilor.

*Monokină.* Citokine secretate de către monocite şi macrofage.

*Mutagen.* Factor fizic sau chimic care poate induce "mutaţii" în genomul celular.

*Mutaţie somatică.* Proces care are loc în cursul maturării celulare. În cazul limfocitelor *B*, se acţionează asupra genelor care codifică pentru regiunea variabilă a moleculei de imunoglobulină, imprimându-i un potenţial de recunoaştere specifică a epitopului diferit de cel existent înainte de mutaţie.

*NADPH.* Nicotin-amid- adenin-dinucleotid-fosfat.

*Neoplazic.* Ţesut tumoral.

*Non-responder.* Care "nu răspunde", care nu reacţionează la stimulii antigenici sau mitogenici.

*Non-self.* Străin de organism, non-propriu.

*N-terminal.* Extremitatea lanţului polipeptidic cu gruparea aminică $NH_2$ liberă.

*Nu/Nu.* Şoareci atimici congenital. Deoarece sunt lipsiţi de păr se mai numesc şi "nuzi". Nu au limfocitele *T* şi nu pot rejecta grefele.

*NZB/W.* Tulpină de şoareci care dezvoltă spontan o boală autoimună, asemănătoare lupusului eritematos sistemic al omului.

*Oligoclonal.* Produs de către puţine clone de celule.

*Oncofetal.* Caracter comun ţesutului embrionar şi neoplazic.

*Omolog.* Termen sinonim cu "alogen", semnifică existenţa unor diferenţe genetice la nivelul antigenelor de histocompatibilitate existente la indivizi aparţinând aceleiaşi specii. Asemănător, sinonim.

*Oncogenă.* Genă responsabilă de multiplicarea celulei şi, uneori, de deviaţia neoplazică a ei.

*Opsonină.* Component seric, de regulă anticorp sau complement, care se leagă citofil la membrana celulei fagocitare facilizând fagocitoza.

*Opsonizare.* Proces care facilitează fagocitoza datorită reacţiei opsoninelor anticorpilor cu antigenul şi celula fagocitară.

*Ovalbumină.* Proteină de 44 kD. Este albumina de ou, similară albuminei din serul păsărilor.

*$O^{-}_2$.* Superoxid anion. Specie foarte toxică de oxigen.

*$^{\cdot}O_2$.* Singlet oxigen (oxigen "unic"), toxic.

*$^1O_2$.* Altă notare pentru oxigenul unic.

*$OH^{\cdot}$.* Hidroxil radical.

*PAF.* Factorul de activare a trombocitelor (Platelet Activating Factor). Este eliberat de bazofile şi provoacă agregarea trombocitelor.

*Papaină.* Enzimă proteolitică (endopeptidază) obţinută din planta tropicală *Carica papaya.* Hidrolizează proteinele.

*Paracrin.* Acţiunea hormonilor asupra altor celule decât cele care i-au sintetizat.

*Paralizie imunologică.* Lipsa răspunsului imun la un stimul antigenic datorită blocării mai multor clone de limfocite.

*Paratop.* Faţa interioară a situsului combinativ, complementară epitopului.

*PCR*. Polymerase Chain Reaction - reacţie polimerazică în lanţ.
*PDE*. Fosfodiesterază.
*PFC*. Plaque forming cells (celule formatoare de plaje hemolitice *in vitro*).
*PHA*. Fitohemaglutinina, o lectină mitogenă pentru limfocitele *T*, extrasă din *Phaseolus vulgaris*.
*Phytolacca americana*. Plantă din care se extrage PWM, lectină mitogenă pentru limfocitele *T* şi *B*.
*PI*. Fosfatidil-inozitol.
*Piesă secretorie*. Proteină asociată cu dimerul IgA secretor, care-i conferă rezistenţă la atacul enzimatic.
*Pinocitoză*. Proces prin care sunt captate şi transportate în interiorul celulei moleculele mici (< 0,1$\mu$).
*PKA, PKC*. Protein-kinaze A sau C.
*PLA, PLC*. Fosfolipaze A sau C;
*Placă Peyer*. Aglomerare limfoidă situată sub mucoasa intestinului subţire. Plăcile Peyer sunt în special la nivelul ileonului şi au rol de organe limfoide secundare.
*Plasmafereză*. Metodă de separare *in vitro* a plasmei de elementele figurate ale sângelui, urmată de reinocularea celulelor şi reţinerea plasmei. Se aplică în scop terapeutic în mieloame multiple pentru îndepărtarea excesului de proteine.
*Plasmocit*. Limfocit *B* ajuns în stadiul final de diferenţiere, când sintetizează anticorpi.
*Plasmocitom*. Tumoră formată din plasmocite care secretă activ imuno-globuline.
*PWM*. Pokeweed mitogen, lectină extrasă din *Phytolacca americana*.
*Policlonal*. Produsul mai multor clone de limfocite.
*Polizaharid capsular*. Polimer glucidic de origine bacteriană.
*Premuniţie*. Protecţie specifică realizată de prezenţa în organism a unui număr mic de agenţi patogeni (bacterii, paraziţi). Prezenţa acestora nu permite penetrarea şi multiplicarea altora, cum se întâmplă în tuberculoză, parazitoze etc.
*Prezentator de antigen*. Celulă care prezintă antigenul altor celule (APC sau Antigen Presenting Cells).
*Primed*. Sensibilizat. Termen care defineşte o populaţie celulară care are deja informaţii despre antigen.
*Profil antigenic*. Totalitatea antigenelor exprimate pe suprafaţa unei celule.
*Propriu*. Termenul defineşte apartenenţa antigenelor la organismul din care fac parte şi limfocitele.
*Prostaglandine*. Metaboliţi ai acidului arahidonic, biologic activi, cu multiple implicaţii funcţionale.
*Proteina A*. Proteină existentă în peretele stafilococilor care se leagă la fragmentul *Fc* al IgG.
*Proteine Bence-Jones*. Dimeri de lanţuri uşoare *(L)* existenţi în urina pacienţilor cu mielomatoză. Precipită la $60^0$C şi se redizolvă la $90^0$C.
*Proteina C reactivă*. Proteină sintetizată în ficat sub influenţa unor citokine. Apare în ser numai în cursul proceselor inflamatorii acute sau în cazul unor necroze. Formează precipitate cu $Ca^{2+}$ şi cu polizaharizii penumococici.
*Proteina de fază acută*. Sinonim cu proteina C reactivă.
*Proteinkinaze*. Enzime responsabile de fosforilarea proteinelor.
*Pseudogenă*. Genă care are o structură omoloagă altor gene, dar care nu este exprimată funcţional.
*Punct izoelectric*. Valoare a *p*H-ului în care numărul grupărilor pozitive (bazice) este egal cu cel al grupărilor negative (acide).

*Quenching.* "Stingere". Oprirea unor procese active.

*Radioimunodozare.* Tehnică foarte sensibilă folosită pentru măsurarea concentraţiior de antigen sau anticorp, care include, pe lângă alţi reagenţi, şi izotopi radioactivi.

*Radio-imuno-assay.* Termen englez pentru "radioimunodozare", adică pentru "dozare imună cu agenţi radioactivi".

*Rapel.* Reinocularea antigenului pentru a obţine un răspuns imun secundar mai intens.

*Răspuns anamnestic.* Răspuns imun secundar obţinut după contactul cu acelaşi antigen de care sistemul imun îşi "aminteşte".

*Răspuns imun.* Ansamblul modificărilor la nivelul organelor şi celulelor sistemului imun, instalate după un stimul antigenic, care ţintesc neutralizarea şi eliminarea antigenului.

*Răspuns imun primar.* Se instalează după primul contact cu antigenul. Anticorpii aparţin clasei IgM.

*Răspuns imun secundar.* Se instalează după două sau mai multe contacte cu acelaşi antigen. Anticorpii aparţin clasei IgG.

*RE.* Reticul endoplasmic.

*Reacţie antigen-anticorp.* Modificare rezultată din combinaţia paratopului cu epitopul. Poate fi cuantificată, manifestându-se ca reacţii de precipitare, aglutinare, floculare etc.

*Reacţie Arthus.* Sinonim: "fenomen Arthus". Reacţie de hipersensibilitate imediată de tip III obţinută prin inocularea intravenoasă a serului imun şi intradermică a antigenului. După 2-4 ore, la locul de inoculare a antigenului apare un edem indurat, hemoragie, necroză, declanşate de precipitatul antigen-anticorp.

*Reacţie GVH.* Reacţie grefă contra-gazdă (graft versus host), instalată în cazul transferului de limfocite imunocompetente la un organism incompetent imunologic. Limfocitele mature alogene se multiplică şi recunosc ca străine antigenele gazdei pe care le distrug. Organismul gazdă scade în greutate, se piperniceşte, splina şi ficatul cresc în volum, se instalează diaree gravă iar sfârşitul este letal. Fenomenul imunologic este identic celui de rejecţie de alogrefă dar, în acest caz, grefa este întregul organism al gazdei.

*Reagină.* Anticorp din clasa IgE care se fixează pe fragmentul *Fc* al FcεR de pe membrana mastocitelor şi bazofilelor. Fixarea este urmată de eliberarea de amine vasoactive responsabile de producerea reacţiilor alergice de tip I.

*Rearanjare.* Proces prin care se modifică poziţia genelor într-o manieră care realizează diversificări antigenice ale moleculelor.

*Receptor.* Structură complexă, macromoleculară, exprimată la nivelul celulei, prin care aceasta poate lega specific un ligand de la care primeşte diferite mesaje.

*Recesiv.* Caracter genetic neexprimat fenotipic.

*Recombinare.* Proces care are loc în cursul meiozei, prin care se reorganizează informaţia genetică. Rearanjările au loc la nivelul ADN, cu implicare de gene care vor codifica pentru sinteza proteinelor.

*Reconstituire.* Repopularea cu limfocite a unui organism căruia i s-au distrus prin iradiere letală celulele sistemului imun.

*Redistribuire polară.* Regruparea, într-un punct de pe membrana celulei, a moleculelor existente pe suprafaţa ei, care eventual au fixat un ligand (antigen sau anticorp), în vederea internalizării lor.

*Rejecţie.* Eliminarea imună specifică a unor ţesuturi sau celule alogene sau xenogene.

*Represie.* Inhibarea exprimării unei funcţii sau caracter.

*Restricţie alogenică.* Obligativitatea existenţei de molecule MHC identice atât la nivelul limfocitelor cât şi la nivelul celulelor APC, în cursul prezentării antigenului. Limfocitele *T* nu pot recunoaşte antigenul dacă acesta este asociat cu molecule MHC alogene.

*Rozete.* Tehnică de identificare a celulelor care au receptori pentru anumiţi liganzi, cum este cazul limfocitelor *T* umane car au receptori E pentru hematiile de oaie. *In vitro,* leagă hematiile care se dispun de jur împrejurul limfocitului sub formă de "rozete". Există rozete E (limfocit *T*+ eritrocit), rozete EA (limfocit *T*+ eritrocit + anticorp), rozete EAC (limfocit *T* + eritrocit + anticorp + complement).

*Runt disease.* Termen englez pentru "boala pipernicirii".

*SBTI.* Soybean trypsin inhibitor.

*Segregare.* Distribuirea genelor în gameţi.

*Selecţie clonală.* Baza fundamentală a activării limfocitelor, consecutiv stimulării de către antigen numai a clonelor cu receptori pentru el.

*Selecţie negativă.* Distrugerea precursorilor celulari de la nivelul timusului (limfocitele *T*) sau măduvei osoase (limfocitele *B*) care au receptori pentru antigenele proprii ale organismului.

*Selecţie pozitivă.* Selectarea precursorilor limfocitari la nivelul organelor limfoide primare capabili să recunoască antigenele MHC proprii şi epitopii non-proprii organismului.

*Self.* Propriu. Antigene proprii organismului.

*Sensibilizare.* Câştigarea de către limfocite a capacităţii de a reacţiona specific şi intens faţă de un antigen, consecutiv contactului cu acesta.

*Ser.* Lichidul în care circulă elementele figurate ale sângelui, rămas după îndepărtarea acestora şi a fibrinei.

*Seroterapie.* Inocularea în scop terapeutic a unui ser imun.

*Sindrom de imunodeficienţă dobândită.* Alterarea gravă a funcţiilor imune datorită distrugerii limfocitelor *T* şi macrofagelor de către virusul HIV (sinonim: AIDS, SIDA).

*Sinergism.* Cooperare interacţională.

*Singenic.* Animale identice genetic la nivelul tuturor cromozomilor autosomali.

*Sistemul H-2.* Vezi H-2.

*Sistemul HLA.* Vezi HLA.

*Situs de combinare.* Locul de pe molecula de anticorp prin care aceasta se combină cu antigenul. Sinonim: situs combinativ.

*SOD.* Superoxiddismutază. Enzimă care acţionează asupra speciilor toxice de oxigen ($O^-_2$).

*SpA.* Termen prescurtat pentru proteina A stafilococică.

*Specific.* Modalitate strictă de recunoaştere a unui epitop.

*Specific pathogen free.* Animale lipsite de germeni patogeni, agenţi etiologici pentru unele boli infecţioase.

*Splenomegalie.* Creşterea în volum a splinei.

*Steric.* Conformaţia spaţială a unei molecule.

*Stimul antigenic primar.* Primul contact al organismului cu antigenul.

*Stimul antigenic secundar.* Contactul organismului cu un antigen pe care l-a mai întâlnit anterior.

*Strain.* Tulpină. Termen englez care defineşte o populaţie bacteriană, celulară sau un grup de animale provenite dintr-un progenitor comun şi care au caractere genetice comune.

*Stres.* Sindromul de adaptare la acţiunea distructivă a unor factori de mediu.

*Structură primară.* Secvenţa aminoacizilor în lanţul polipeptidic.

*Structură secundară*. Aranjarea în spaţiu a lanţurilor polipeptidice care, sub influenţa diferitelor forţe de atracţie dintre reziduurile de aminoacizi, se "pliază" conferind moleculei diferite forme sterice.

*Superantigene*. Compuşi capabili să activeze policlonal limfocitele *T*. Sunt de origine exogenă (proteine bacteriene, în special din streptococi, stafilococi şi micoplasme) sau endogenă ("proprii" organismului), produse de către gene care stimulează sistemul imun provocând reacţii distructive (Gena Mls=minor lymphocyte stimulating).

*Supravegherea imunologică*. Teorie conform căreia sistemul imun al organismului controlează permanent formarea de celule aberante, neoplazice, pe care le elimină.

*Supresie*. Blocarea exprimării unor funcţii sau caractere biologice.

*Supresia alotipică*. Inhibiţia sintezei unor molecule de imunoglobulină cu o anumită specificitate alotipică.

*Switch*. Cuvânt englez pentru termenul "comutare".

*Şoareci consangvini*. Vezi "consangvin".

*Şoc anafilactic*. Manifestare sistemică, acută, a anafilaxiei, caracterizată prin hipotensiune, bronhoconstricţie şi tulburări grave respiratorii, cu sfârşit letal.

*Teoria instructivă.* Teorie conform căreia antigenul acţionează ca o "matriţă" asupra moleculei de anticorp în formare, imprimându-i forma sa complementară.

*Teoria lanţurilor laterale.* Postulează că celulele formatoare de anticorpi au pe membrana lor lanţuri laterale terminate cu o extremitate prin care recunosc specific epitopul. În urma combinării cu antigenul, se desprind şi ajung în circulaţie sub formă de molecule de anticorp, celula exprimând alte lanţuri "laterale".

*Teoria selectivă.* Susţine că în organism există celule cu receptori preformaţi care sunt destinate să recunoască specific epitopii. Spre deosebire de cea a "lanţurilor laterale" care susţinea că un limfocit are receptori pentru toţi epitopii din natură, cea selectivă susţine că în organism sunt atâtea clone (ramuri, linii) de celule câţi epitopi sunt în natură, fiecare clonă exprimând receptori pentru un singur epitop pe care este predestinat să-l recunoască.

*Test de inhibiţie.* Metodă serologică prin care se inhibă posibilitatea reacţiei specifice dintre un ser imun sau celule efectoare şi antigenul respectiv.

*Test de neutralizare*. Evaluarea cantitativă a anticorpilor pe baza capacităţii lor de a neutraliza efectele biologice ale unui antigen.

*Test de transformare blastică.* Vezi "blastogeneză".

*Test Mantoux.* Vezi "intradermoreacţie".

*Timectomie.* Extirparea timusului.

*Timidină tritiată.* Nucleotid pirimidinic, precursor al ADN, marcat cu izotopul hidrogenului $^{3}$H (tritiu).

*Timp de înjumătăţire.* Timpul necesar, exprimat în zile, pentru a se reduce la jumătate numărul de molecule existent într-o populaţie omogenă de molecule.

*Titru.* Raportul invers al celei mai mari diluţii dintr-un ser imun care mai recţionează specific cu antigenul, formând precipitate sau aglutinate vizibile cu ochiul liber.

*Tulpină.* Vezi "strain".

*Toleranţă.* Areactivitate imunologică specifică faţă de un anumit antigen.

*Tolerogen.* Produs care poate induce toleranţa imunologică.

*TPCK.* L-1-tosiamid, 2-fenil-etil, clorometil-cetonă.

*Transfer de celule.* Inocularea unei suspensii de celule, recoltate de la un organism, altui organism.

*Turnover.* Durata de viaţă a unei celule, definită ca interval de timp dintre două diviziuni mitotice sau dintre o diviziune mitotică şi moartea ei. Sinonim cu durata de viaţă a unei molecule existentă în ser sau pe membrana celulară.

*Tx.* Tromboxani, derivaţi din acidul arahidonic pe cale ciclooxigenazică.

*Ţesut limfoid.* Totalitatea componentelor sistemului imun: organe limfoide primare, secundare, celule etc.

*Ultracentrifugare.* Centrifugare la viteză înaltă, peste 100 000 de rotaţii/minut.

*Ultrafiltrare.* Metodă de separare cu ajutorul membranelor care au pori mici, cu diametre bine cunoscute, a moleculelor aflate într-un amestec cu alte molecule de dimensiuni diferite. Prin porii membranei vor trece numai moleculele cu dimensiuni mai mici. Procedeul este folosit şi pentru separarea virusurilor de bacterii.

*Umoral.* Sistem alcătuit din molecule aflate în soluţii (umori). În imunologie se foloseşte termenul "răspuns imun umoral" care semnifică existenţa unui răspuns efectuat de către anticorpi.

*Unitate Svedberg.* Defineşte coeficientul de sedimentare a moleculelor egal cu $10^{-13}$ secunde. De exemplu, coeficientul de sedimentare $7 \cdot 10^{-13}$ se notează 7 S, cel $19 \cdot 10^{-13}$ se notează 19 S etc.

*Uropod.* Porţiunea alungită a celulei prin care se fixează la un punct fix de pe suprafaţa pe care se deplasează celula respectivă (granulocit PMN) şi care prin contracţie ajută la deplasarea întregii celule în sensul aducerii extremităţii opuse, "posterioare", în dreptul uropodului fixat, desprinderii acestuia şi fixării la alt punct mai îndepărtat etc.

*Urticarie.* Erupţie papuloeritematoasă cutanată, însoţită uneori de mâncărimi ale pielii. Apare în hipersensibilitatea de tip I, mai ales atunci când alergenul a fost introdus în organism pe cale bucală.

*Vaccin.* Produs biologic cu proprietăţi imunizante care poate conferi protecţie faţă de o boală provocată de bacterii, virusuri sau paraziţi. Un vaccin trebuie obligatoriu să fie apatogen şi imunogen.

*Vaccinare.* Inocularea parenterală sau orală a unui vaccin.

*Valenţă.* Numărul de grupări determinante sau de situsuri combinative existente pe o moleculă de antigen, respectiv pe o moleculă de anticorp.

*Variaţie antigenică.* Vezi "modulaţie antigenică".

*VIP.* Peptidă intestinală vasoactivă.

*VLA.* Molecule din familia integrinelor cu rol în aderarea intercelulară. Sunt iniţialele cuvintelor "Very Late Antigen" (antigen exprimat foarte târziu).

*VN.* Vitronectină. Moleculă din familia integrinelor, cu rol în adeziunea celulară.

*Xenogen.* Diferenţe antigenice existente între celulele şi ţesuturile unor indivizi care aparţin la două specii diferite (" Xenos" = străin). Sinonim = heterolog.

*Xenogrefă.* Sinonim cu "heterogrefă" sau cu "grefă heterologă".

*Xenotip.* Tip antigenic distinct, specific unei specii şi străin altei specii.

*Zimozan.* Polizaharizi insolubili, izolaţi din peretele celular al drojdiei de bere *(Sacharomyces cerevisiae)*, care pot activa pe cale alternativă complementul.

*Zimozan opsonizat.* Complex format din zimozan şi anticorpii IgG cu specificitate pentru zimozan, utilizat pentru studiul receptorilor *Fc* de pe membrana plasmatică a unor celule, în special a macrofagelor şi granulocitelor PMN.

# BIBLIOGRAFIE

AKBAR A.N., SALMON M., JANOSSY C - *The synergy between naive and memory T cells during activation*, Immunol. Today, 1991, *12*, 184 - 188.

ALBERTS B., BRAY D. - *Molecular biology of the cell*, In: "Garland Publishing Inc.", New-York, 1983, pp. 319 - 384, London.

ALEXANDER D., SHIROO M., ROBINSON A., BIFFEN M., SHIVAN E. -*The role of CD45 in T-cell activation. Resolving the paradoxes?*, Immunol. Today, 1992, *13* (12), 477-480.

ALLISON J.P., LANIER L.L. - *The T-cell antigen receptor gamma gene: rearrangement and cell lineages*, Immunol. Today, 1987, *8*, 293 - 296.

ANDRIEŞ L., OLINESCU A. - *Compendiu de Imunologie Fundamentală*, Editura "Ştiinţa", Chişinău, 1992.

AUDIBERT F.M., LISE L.D. - *Adjuvants: Current status, clinical perspectives*, Immunol. Today, 1993, *14* (6), 281 - 284.

BACH J.F. - *Immunosuppressive therapy of autoimmune diseases*, Immunol. Today, 1993, *14* (6), 322 - 326.

BAGGLIONI M., DEWALD B. - *The neutrophil*, Int. Arch. Allergy apll. Immunol., 1985, *76*, 13 - 20.

BALKWILL F. - *Cytokines - soluble factors in immune responses*, Curr. Opinion Immunol., 1988, *1*, 241 - 249.

BANCHEREAU J. *Interleukin 4*, Nucl. Med. Biol., 1990, *17*, 619 - 623.

BELLANTI J.A., ROCKLIN R.E. - Immunology III, Philadelphia W.B. Saunders Company, 1985.

BERNIER G.M. - *Immunoglobulins*, Progr. Allergy, 1970, *14*, 1 - 36.

BIER O.G., Dias da SILVA W., MOTA I - *Fundamental of Immunology*, Berlin, New-York, Springer -Verlag 1981.

BODMER J.G., MARSH S.G.E., ALBERT E. - *Nomenclature for factors of the HLA system*, Immunol. Today, 1990, *11*, 3 - 7.

BOUCK N. - *Tumor angiogenesis. The role of oncogenes and tumor suppressor genes*, Cancer Cell, 1990, 2, 179 - 186.

BRANDTZAEG P. - *Salivary Immunoglobulins*, In: Human saliva. Clinical Chemistry and Microbiology, Vol. II, Ed. J.O. Tenovuo CRC Press Boca Eaton, Florida, 1989.

BRAQUET P.,TOQUI L.,SHEN T.Y.,VARGAFTIG B.D. - *Perspectives in Platelet-activating Factor Research*, Pharmacol. Reviews 1987, *39*, 94 - 145.

BURGRAEVE M. - *Monument a E.D. W. Jenner ou histoire de la vaccine a l'ocasion du première céntenaire de son invention*, Librairie de la Cour, Bruxelles, 1875, pp 7 - 8.

CHIRIGOS M.A., TALMADGE J.E. - *Immunotherapeutic agents: their role in cellular immunity and their therapeutic potential*, Springer Seminar in Immunopathology, 1985, *8*, 327 - 341.

COFFMAN R.L., SEYMOUR B.W.P., LEBMAN D.A. et. al. - *The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation*, Immunol. Rev., 1988, *102*, 5 - 28.

CONRAD D.H. - *Fcε RII/CD23. The low affinity receptor for IgE*, Ann. Rev. Immunol., 1990, *8*, 623 - 645.

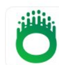
COOMBE D.R., RIDER Ch.C - *Lymphocyte homing receptors cloned. A role for anionic polysaccharides in lymphocyte adhesion*, Immunol.Today, 1989, *10*, 289 - 291.

CUPRINS

Lei 9980

ISBN 973-30-3066-X





EDITURA DIDACTICĂ ŞI PEDAGOGICĂ, R.A. – BUCUREŞTI, 1995